

Université de Montréal

**Rôles des kinases IKK et IKK-related dans les maladies  
inflammatoires chroniques ;  
implications dans l'athérosclérose et la réponse hypoxique**

par

Simon-Pierre Gravel

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de PhD  
en Sciences Pharmaceutiques  
option Pharmacologie

22 décembre 2010

© Simon-Pierre Gravel, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Rôles des kinases IKK et IKK-related dans les maladies inflammatoires chroniques ;  
implications dans l'athérosclérose et la réponse hypoxique

Présentée par :  
Simon-Pierre Gravel

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Denis deBlois, président-rapporteur  
Marc Servant, directeur de recherche  
Philippe Roux, membre du jury  
Stéphane Richard, examinateur externe  
Janos Filep, représentant du doyen de la FES

## Résumé

L'inflammation est un procédé complexe qui vise l'élimination de l'agent causal de dommages tissulaires en vue de faciliter la réparation du tissu affecté. La persistance de l'agent causal ou l'incapacité à résoudre l'inflammation mène à un dérèglement homéostatique chronique qui peut avoir une incidence sur la morbidité et la mortalité. L'athérosclérose est une condition inflammatoire chronique des vaisseaux sanguins dont l'origine est multifactorielle. L'hypertension et l'état infectieux représentent respectivement des facteurs de risque classiques et émergents du développement de cette maladie. Les fondements initiaux de l'inflammation font intervenir l'immunité innée, la première ligne de défense dont disposent les cellules pour répondre à un signal de danger. Le but de cette thèse est d'examiner le rôle pro-inflammatoire d'une famille de kinases essentielles à l'immunité innée, soit celle des kinases de  $\text{I}\kappa\text{B}$  (IKK) et des kinases IKK-related. Les kinases  $\text{IKK}\alpha$  et  $\text{IKK}\beta$  forment le complexe IKK avec la molécule adaptatrice NEMO/ $\text{IKK}\gamma$ . Ce complexe est chargé d'effectuer la phosphorylation de l'inhibiteur de NF- $\kappa\text{B}$ ,  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , ce qui mène à sa dégradation et à la libération du facteur de transcription NF- $\kappa\text{B}$ . Nous montrons que le peptide vasoactif angiotensine II (AngII) induit l'activité phosphotransférase d' $\text{IKK}\beta$  dans les VSMC par immunoprécipitation de NEMO puis essai kinase *in vitro*. Grâce à une approche ARN interférence (ARNi) dirigée contre  $\text{IKK}\beta$ , nous montrons que cette kinase est responsable de la phosphorylation de p65/RelA. Nous montrons que le mécanisme d'induction de NF- $\kappa\text{B}$  par l'AngII est atypique, puisqu'il ne module pas  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ , et montrons à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques que l'activation de p65 est indépendante des voies MEK-ERK-RSK, PI3K et de la transactivation du récepteur de l'EGF. Les kinases IKK-related *Tank-binding kinase 1* (TBK1) et IKK-i sont quant à elles principalement activées suite à une infection bactérienne ou virale. Ces kinases phosphorylent directement le facteur de transcription *interferon regulatory factor* (IRF)-3. Nous montrons que le cytomégalovirus humain, un pathogène associé à l'athérosclérose, a la capacité d'induire l'activation de TBK1 dans les VSMC. L'usage d'ARNi dirigé contre

TBK1 et IKKi montre que les 2 kinases sont impliquées dans l'activation d'IRF-3. De plus, nous montrons à l'aide d'une lignée de VSMC exprimant une version dominante négative d'IRF-3 que ce dernier est essentiel à la synthèse des chimiokines RANTES et IP-10, tel qu'analysé par RT-PCR. Par ailleurs, il a récemment été montré que les kinases IKK-related étaient étroitement liées à la transformation oncogénique, et que TBK1 était pro-angiogénique. Or, l'angiogenèse est le plus souvent modulée par la réponse hypoxique qui est d'ailleurs commune à la majorité des processus inflammatoires. Le facteur de transcription *hypoxia inducible factor* (HIF)-1 module l'angiogenèse, l'inflammation et la survie cellulaire. Nous montrons à l'aide de cellules *Tbk1* et *Ikkbe*<sup>-/-</sup> et d'une approche lentivirale que TBK1 est spécifiquement impliquée dans l'induction traductionnelle de HIF-1 $\alpha$  en condition de stress hypoxique. L'expression de TBK1 est induite sous ces conditions, et cette kinase module la phosphorylation de ERK, RSK, Akt et TSC1. Les résultats originaux présentés dans cette thèse montrent donc que les kinases IKK et IKK-related exercent leurs actions pro-inflammatoires par des mécanismes distincts.

**Mots-clés :** Athérosclérose, TBK1, IKK, IRF-3, NF- $\kappa$ B, HIF-1, cytomégalo virus, angiotensine II, cytokines, hypoxie



## Abstract

Inflammation is a complex process that allows elimination of tissular damaging agents and thus facilitates wound repair. Persistence of a damaging agent or the incapacity to resolve the inflammatory state leads to chronic homeostatic deregulation with putative incidence on morbidity and mortality. Atherosclerosis is an inflammatory state of blood vessels which origins are multifactorial. Hypertension and the infectious state represent classical and emerging factors of atherosclerosis development, respectively. The innate immune response takes place in the initial steps of inflammation, and represents the first cellular line of defense against danger signals. The goal of this thesis is to examine the pro-inflammatory roles of the I $\kappa$ B kinases (IKK) and the IKK-related kinases, which are essential innate immune response protein kinases. IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  form, together with NEMO/IKK $\gamma$ , the IKK complex. This complex is responsible of the phosphorylation of the inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , a process that leads to its degradation and NF- $\kappa$ B release. By immunoprecipitation of NEMO and assessment of the IKK complex activity *in vitro*, we show that the vasoactive peptide angiotensin II (AngII) induces IKK $\beta$  phosphotransferase activity in vascular smooth muscle cells (VSMC). The use of RNA interference (RNAi) against IKK $\beta$  reveals that this kinase is responsible for p65/RelA phosphorylation. AngII modulation of NF- $\kappa$ B is atypical since it does not modulate I $\kappa$ B. Moreover, the use of pharmacological inhibitors shows that p65 induction is independent of both MEK-ERK-RSK and PI3K pathways, and that it does not involve EGF receptor transactivation. IKK-related kinases Tank-binding kinase 1 (TBK1) and IKK-i are known to be induced by bacterial and viral infections. These kinases are able to phosphorylate directly interferon regulatory factor (IRF)-3 transcription factor. Human cytomegalovirus (HCMV) seropositivity was shown to be linked to atherosclerosis development. We show that TBK1 activity is induced in HCMV-infected VSMC. RNAi directed against TBK1 and IKK-i reveals that both kinases are required for IRF-3 activation. The use of a VSMC line that express a dominant negative version of IRF-3 shows that this transcription factor is involved

in the induction of RANTES and IP-10 chemokines, as assessed by RT-PCR. In addition, IKK-related kinases were recently shown to be implicated in oncogenic transformation. TBK1 was also shown to be pro-angiogenic. Angiogenesis is known to be regulated by the hypoxic response, a common condition of inflammatory processes. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 is a transcription factor that modulates angiogenesis, inflammation and cell survival. We show with the use of *Tbk1* and *Ikkbe*<sup>-/-</sup> cells combined with the use of a lentiviral approach that TBK1 is specifically involved in HIF-1 $\alpha$  translational induction under hypoxic stress. We also show that TBK1 expression is enhanced under these conditions, and that this kinase modulates the phosphorylation of ERK, RSK, Akt and TSC1. In conclusion, the results presented in this thesis show that the IKK and IKK-related kinases are both pro-inflammatory, and exert their actions by distinct mechanisms.

**Keywords :** Atherosclerosis, TBK1, IKK, IRF-3, NF- $\kappa$ B, HIF-1, cytomegalovirus, angiotensin II, cytokines, hypoxia

## Table des matières

Résumé .....	i
Abstract .....	iii
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures .....	x
Abréviations .....	xiii
Remerciements .....	xix
Introduction (chapitres 1 à 3) .....	1
1. Vision actuelle de l'inflammation .....	2
1.1 Les 4 points cardinaux de l'inflammation .....	2
1.2 Terminologies .....	3
1.3 L'inflammation aigüe .....	4
1.3.1 Dommage tissulaire .....	5
1.3.1.1 Le type de mort cellulaire dicte la nature de la réponse immunitaire .....	5
1.3.1.2 Implication des organelles dans la mort cellulaire et l'inflammation .....	6
1.3.2 Reconnaissance de signaux de danger .....	8
1.3.2.1 Les récepteurs de signaux de danger sont nombreux et polyvalents .....	9
1.3.2.2 Les TLRs .....	10
1.3.2.3 Les RLRs .....	15
1.3.2.4 Les NLRs et les inflammasomes .....	16
1.3.2.5 Les ligands modifiés chimiquement .....	20
1.3.3 Modifications de l'endothélium en conditions inflammatoires .....	20
1.3.3.1 Augmentation de la perméabilité de l'endothélium .....	21
1.3.3.2 Expression induite de molécules d'adhésion .....	22
1.3.4 Les leucocytes et le destin de l'inflammation .....	23

1.4 Les cytokines sont des modulatrices majeures de l'inflammation.....	25
1.4.1 IL-6.....	27
1.4.2 Les chimiokines .....	29
1.5 Inflammation chronique et para-inflammation .....	31
1.6 Inflammation, cancer et hypoxie.....	34
1.6.1 HIF-1 .....	35
1.6.2 Régulation complexe de HIF-1 $\alpha$ .....	38
1.6.3 Le paradoxe traductionnel en hypoxie .....	41
2. Bases inflammatoires de l'athérosclérose .....	47
2.1 Incidence et complications de l'athérosclérose.....	47
2.2 Une maladie inflammatoire.....	51
2.2.1 La localisation des lésions informe sur leur genèse .....	51
2.2.2 Les lipides au cœur de l'inflammation.....	54
2.2.3 L'inflammation sous la rupture de la plaque.....	55
2.2.3.1 Vulnérabilité de la plaque .....	55
2.2.3.2 Causes de rupture .....	56
2.2.3.3. Implications d'autres types cellulaires.....	57
2.2.3.4 Rôle de la réponse hypoxique .....	58
2.3 La cellule musculaire lisse vasculaire .....	59
2.3.1 Les phénotypes contractiles et synthétiques .....	59
2.3.2 Origine des VSMC de la néo-intima.....	61
2.3.3 Plasticité et rôles inflammatoires des VSMC.....	61
2.4 Facteurs de risque de l'athérosclérose.....	64
2.4.1 Rôles pro-inflammatoires de l'Angiotensine II.....	65
2.4.1.1 Les différents systèmes rénine-angiotensine (RAS) .....	65
2.4.1.2 Récepteurs de l'angiotensine II.....	69
2.4.1.3 Signalisation pro-inflammatoire du récepteur AT1 .....	71
2.4.2 Rôles pro-inflammatoires du cytomégalo virus humain .....	74

2.4.2.1 Évidences expérimentales d'un lien entre l'état infectieux et l'athérogenèse.	74
2.4.2.2 La biologie du HCMV	77
2.4.2.3 HCMV et athérosclérose et chez l'humain	80
2.4.2.4 Mécanismes pro-inflammatoires du HCMV dans les VSMC	82
3. Les kinases IKK et IKK-related	85
3.1 Caractéristiques générales	85
3.2 L'activation de NF- $\kappa$ B	92
3.2.1 Fondements de l'activation de NF- $\kappa$ B	92
3.2.2 Les familles NF- $\kappa$ B et I $\kappa$ B	95
3.2.3 Voies d'activation de NF- $\kappa$ B	99
3.2.4 Régulation complexe de p65	101
3.3 Activation d'IRF-3	102
3.3.1 De l'interféron aux IRFs	102
3.3.2 De la caractérisation d'IRF-3 à ses kinases	106
3.3.3 IRF-3 : un initiateur de la réponse antivirale encore peu connu.	108
3.4 Voies d'activation des kinases IKK-related et rôles émergents dans le cancer et la réponse hypoxique.	112
3.5 Retour sur les idées directrices des 3 chapitres	116
4. Hypothèses, objectifs et méthodologie	118
4.1 Article #1	119
4.2 Article #2	121
4.3 Article #3	123
5. Articles scientifiques	125
5.1 ARTICLE #1	126
5.1.1 Description du travail effectué par le candidat	126
5.1.2 Permission de l'éditeur	127
5.1.3 Accord des coauteurs	128
5.1.4 Article original	129

5.1.5 Résultats connexes .....	178
5.2 ARTICLE # 2 .....	185
5.2.1 Description du travail effectué par le candidat. ....	185
5.2.2 Permission de l'éditeur.....	186
5.2.3 Accord des coauteurs .....	187
5.2.4 Article original .....	188
5.2.5 Résultats connexes .....	235
5.3 ARTICLE #3 .....	237
5.3.1 Travail effectué par le candidat.....	237
5.3.2 Accord des coauteurs .....	238
5.3.3 Manuscrit .....	239
5.3.4 Résultats connexes .....	285
6. Discussion .....	287
6.1 Discussion autour de l'article « Roles of an IkappaB kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions » (publié).....	288
6.1.1 Importance de l'étude, résultats connexes et suivi de la littérature.....	288
6.1.2 En quête des effecteurs en amont de TBK1 en réponse au HCMV .....	295
6.1.3 Perspectives.....	301
6.2 Discussion autour de l'article « The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the IkappaB kinase complex » (publié) .....	303
6.2.1 Importance de l'étude et résultats connexes.....	303
6.2.2 Récents développements et perspectives .....	307
6.3 Discussion autour de l'article « TANK-Binding Kinase-1 is an essential modulator of HIF-1alpha translational induction during hypoxic stress » (manuscrit) .....	309
6.4 Ouverture : les kinases IKK et IKK-related sont-elles des cibles pharmacologiques potentielles pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques ?.....	315
7. Conclusion .....	319
Bibliographie.....	320

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 : Exemples de récepteurs des immunostimulants endogènes et exogènes et leur association aux maladies inflammatoires.</b> .....	11
<b>Tableau 2 : Molécules d'adhésion endothéliales induites lors de l'inflammation.</b> .....	23
<b>Tableau 3 : Aperçu de la diversité des cytokines pro-inflammatoires et de leurs associations aux maladies inflammatoires chroniques.</b> .....	26
<b>Tableau 4 : Facteurs de transcription qui modulent le gène <i>HIF1A</i>.</b> .....	40
<b>Tableau 5 : Exemples d'inducteurs de HIF-1alpha et mécanismes d'induction.</b> .....	45
<b>Tableau 6 : Exemples de marqueurs et caractéristiques des VSMC.</b> .....	62
<b>Tableau 7 : Expression des composantes du RAS local au niveau des vaisseaux sanguins.</b> .....	68
<b>Tableau 8: Famille des IRFs et chevauchement de leurs rôles.</b> .....	105
<b>Tableau 9 : Présentation des objectifs et de la méthodologie de l'article #1.</b> .....	120
<b>Tableau 10 : Présentation des objectifs et de la méthodologie de l'article #2.</b> .....	122
<b>Tableau 11 : Présentation des objectifs et de la méthodologie de l'article #3.</b> .....	124
<b>Tableau 12 : Molécules impliquées dans la réponse interféron suite à la reconnaissance d'ADNdb.</b> .....	299

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Principales étapes de l'inflammation aigüe.</b>	<b>4</b>
<b>Figure 2 : Les états cellulaires dictent la réponse inflammatoire.</b>	<b>7</b>
<b>Figure 3 : Représentation schématique des TLRs et de leurs cinq adaptateurs.</b>	<b>13</b>
<b>Figure 4 : Différentes voies de signalisation induites par les TLRs en fonction de leurs différents adaptateurs.</b>	<b>14</b>
<b>Figure 5 : Voies pro-inflammatoires induites par les RLRs.</b>	<b>17</b>
<b>Figure 6 : Voies pro-inflammatoires induites par les NLRs.</b>	<b>19</b>
<b>Figure 7 : Voies de signalisation principales d'IL-6.</b>	<b>28</b>
<b>Figure 8 : Exemples de voies de signalisation induites par les chimiokines.</b>	<b>30</b>
<b>Figure 9 : Distinction entre les différentes formes d'inflammation et implications cliniques.</b>	<b>33</b>
<b>Figure 10 : Aperçu de la régulation et du rôle de HIF-1alpha en hypoxie.</b>	<b>37</b>
<b>Figure 11 : Contexte génomique de HIF1A et régulation transcriptionnelle.</b>	<b>39</b>
<b>Figure 12 : Modulation de l'initiation de la traduction en condition hypoxique.</b>	<b>42</b>
<b>Figure 13 : Régulation du messager de HIF-1alpha par les RBPs.</b>	<b>44</b>
<b>Figure 14 : Schéma représentant les modifications morphologiques d'artères atteintes d'athérosclérose.</b>	<b>49</b>
<b>Figure 15 : Stades du développement de l'athérosclérose selon l'AHA.</b>	<b>50</b>
<b>Figure 16 : Vision actuelle du système rénine-angiotensine (RAS).</b>	<b>67</b>
<b>Figure 17 : Le récepteur AT1 humain de l'angiotensine II (et III).</b>	<b>70</b>
<b>Figure 18 : Exemples de voies de signalisation pro-inflammatoires induites par l'angiotensine II via le récepteur AT1 dans les VSMC.</b>	<b>73</b>
<b>Figure 19 : Histogramme du nombre de publications associant un thème à l'athérosclérose dans Pubmed (1990-2009).</b>	<b>75</b>
<b>Figure 20 : Schéma de la structure du virion et des principales étapes du cycle de réplication du HCMV.</b>	<b>78</b>



<b>Figure 21 : Exemples de voies pro-inflammatoires pouvant être induites par le HCMV dans les VSMC.</b>	83
<b>Figure 22 : Domaines, modifications post-traductionnelles et partenaires des kinases IKK et IKK-related.</b>	87
<b>Figure 23 : Modèle d'activation des kinases IKK.</b>	88
<b>Figure 24 : Substrats partagés et spécifiques des kinases IKK et IKK-related.</b>	91
<b>Figure 25 : Survol des découvertes charnières dans les domaines d'étude de NF-kappaB.</b>	93
<b>Figure 26 : Schéma de la structure des membres de la famille NF-kappaB/ IkappaB et principales modifications post-traductionnelles.</b>	96
<b>Figure 27 : Combinaisons possibles des sous-unités de NF-kappaB et maturation des précurseurs p100 et p105.</b>	97
<b>Figure 28 : Voies d'activation du complexe IKK.</b>	100
<b>Figure 29 : Survol des découvertes charnières dans les domaines d'étude des IRFs.</b>	103
<b>Figure 30: Le facteur de transcription IRF-3 : domaines et modifications post-traductionnelles.</b>	107
<b>Figure 31 : Contrôle de l'activation d'IRF-3 et phases d'induction des IFNs de type I.</b>	110
<b>Figure 32 : Éléments ISRE retrouvés au sein de certains promoteurs physiologiques connus pour être régulés par IRF-3.</b>	111
<b>Figure 33 : Voies d'activation des kinases IKK-related dans l'immunité innée et le cancer.</b>	113
<b>Figure 34 : Exemples d'essais inhibiteurs effectués pour identifier les kinases impliquées dans l'activation d'IRF-3 par le HCMV dans les VSMC humaines.</b>	179
<b>Figure 35 : La transcription et la réplication virale ne sont pas impliquées dans l'activation d'IRF-3 par le HCMV.</b>	180
<b>Figure 36 : Un prétraitement au PDGF-BB bloque l'induction d'IRF-3 par le HCMV dans les VSMC</b>	182
<b>Figure 37 : Rôle partiel de VISA dans l'activation d'IRF-3 par le UV-HCMV.</b>	184

<b>Figure 38 : Rôle répresseur de TBK1 dans la signalisation induite par l'AngII.....</b>	<b>236</b>
<b>Figure 39: L'ARN interférence dirigée contre TBK1 favorise la transcription de HIF-1alpha. ....</b>	<b>286</b>
<b>Figure 40 : PRRs et quelques molécules impliquées dans l'activation de la voie TBK1-IRF-3-IFNB1 par l'ADNdb. ....</b>	<b>298</b>
<b>Figure 41: Étude des sites de phosphorylation connus des kinases IKK-related. ....</b>	<b>311</b>
<b>Figure 42 : Ensemble des rôles potentiels de TBK1 dans la régulation traductionnelle de HIF-1alpha. ....</b>	<b>314</b>

## Abréviations

<b>4E-BP</b>	<i>Eucaryotic translation initiation factor 4E binding protein</i>
<b>4E-T</b>	<i>Eucaryotic translation initiation factor 4E transporter</i>
<b>A</b>	Adénine
<b>ACE</b>	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
<b>ADAM</b>	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNdb</b>	ADN double brin
<b>ADNsb</b>	ADN simple brin
<b>AGE</b>	<i>Advanced glycation end products</i>
<b>AGT</b>	Angiotensinogène
<b>AHA</b>	<i>American Heart Association</i>
<b>AIM2</b>	<i>Absent in melanoma 2</i>
<b>Ang</b>	Angiotensine
<b>AngII</b>	Angiotensine II
<b>AP</b>	Aminopeptidase
<b>APC</b>	<i>Antigen-presenting cell</i>
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNi</b>	ARN interférence
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>ARNdb</b>	ARN double brin
<b>ARNsb</b>	ARN simple brin
<b>ARNT</b>	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
<b>AT1</b>	Récepteur AT1 de l'angiotensine
<b>AT</b>	Athérosclérose
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BCL</b>	<i>B cell lymphoma</i>
<b>BCR</b>	<i>B cell receptor</i>
<b>BMP</b>	<i>Bone morphogenic protein</i>
<b>BNIP</b>	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein</i>
<b>C</b>	Cytosine
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion calcium
<b>CARD</b>	<i>Caspase recruitment domain</i>
<b>CBP</b>	<i>CREB binding protein</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CKII</b>	Caséine kinase II
<b>CLR</b>	<i>C-type lectin receptor</i>
<b>Co<sup>2+</sup></b>	Ion cobalt
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de cobalt
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus

<b>COX</b>	Cyclo-oxygénase
<b>CPE</b>	Cytopathic effects
<b>CPE</b>	Cytoplasmic polyadenylation element
<b>CPEB</b>	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein
<b>CpG</b>	Cytosine-phosphate-guanine
<b><i>C. pneumoniae</i></b>	<i>Chlamydiophila pneumoniae</i>
<b>CRP</b>	C-reactive protein
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>DAI</b>	DNA-dependent activator of IRFs
<b>DAMP</b>	Danger-associated molecular pattern
<b>DDX3</b>	DEAD/H box X 3
<b>DEPC</b>	Diéthyl pyrocarbonate
<b>DFX</b>	Desferrioxamine/Desferroamine
<b>DKO</b>	Double knock-out
<b>DN</b>	Dominant negative
<b>EBV</b>	Epstein-Barr virus
<b>EC</b>	Endothelial cell
<b>ECM</b>	Extracellular matrix
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>Egr1</b>	Early growth response factor 1
<b>eIF</b>	Eucaryotic initiation factor
<b>eNOS</b>	Endothelial nitric oxide synthase
<b>EPO</b>	Érythropoïétine
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>ET-1</b>	Endothéline 1
<b>FAK</b>	Focal adhesion kinase
<b>gB/gH</b>	Glycoprotéines B/H (HCMV)
<b>gp</b>	Glycoprotéine
<b>GAS</b>	Gamma interferon activation site
<b>GMPc</b>	Cyclic guanosine monophosphate
<b>GPCR</b>	G protein-coupled receptor
<b>HAU</b>	Hemagglutinin units
<b>HBx</b>	Hepatitis B virus protein x
<b>HCMV</b>	Human cytomegalovirus
<b>HIF</b>	Hypoxia-inducible factor
<b>HLH</b>	Helix-loop-helix
<b><i>H. pylori</i></b>	<i>Helocobacter pylori</i>
<b>HRE</b>	Hypoxia response element
<b>Hsp</b>	Heat-shock protein
<b>HuR</b>	Hu antigen R
<b>I</b>	Inosine
<b>ICAM</b>	Inter-cellular adhesion molecule

<b>IFI16</b>	<i>Gamma-interferon-inducible protein 16</i>
<b>IFN</b>	<i>Interféron</i>
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	<i>Inhibitory <math>\kappa</math>B</i>
<b>IKK</b>	<i>Inhibitor of kappaB kinase</i>
<b>IL</b>	<i>Interleukine</i>
<b>IP-10</b>	<i>Interferon inducible protein 10</i>
<b>IRES</b>	<i>Internal ribosome entry site</i>
<b>IRF</b>	<i>Interferon regulatory factor</i>
<b>ISG</b>	<i>Interferon-stimulated gene</i>
<b>ISRE</b>	<i>Interferon-stimulated response element</i>
<b>JAK</b>	<i>Janus kinase</i>
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>KSHV</b>	<i>Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus</i>
<b>LDL</b>	<i>Low-density lipoprotein</i>
<b>LPA</b>	<i>Lysophosphatidic acid</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharide</i>
<b>LRR</b>	<i>Leucine-rich repeat</i>
<b>LZ</b>	<i>Leucine Zipper</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>MCMV</b>	<i>Murine/mouse cytomegalovirus</i>
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
<b>MDA5</b>	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
<b>MEF</b>	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
<b>MEK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase</i>
<b>MICI</b>	<i>Maladie inflammatoire chronique de l'intestin</i>
<b>MMP</b>	<i>Matrix metalloproteinase</i>
<b>MOI</b>	<i>Multiplicity order of infection</i>
<b>MRC5</b>	<i>Medical Research Council 5</i>
<b>mTOR</b>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
<b>MyD88</b>	<i>MYeloid Differentiation 88</i>
<b>NALP</b>	<i>NACHT-, LRR- and pyrin</i>
<b>NEMO</b>	<i>NF-kappa-B essential modulator;</i>
<b>NES</b>	<i>Nuclear export sequence</i>
<b>NF</b>	<i>Nuclear factor</i>
<b>NLR</b>	<i>Nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing</i>
<b>NOD</b>	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
<b>NSAIDs</b>	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>
<b>O<sub>2</sub></b>	<i>Oxygène moléculaire</i>
<b>ODDD</b>	<i>Oxygen-dependent degradation domain</i>
<b>Ox-LDL</b>	<i>Oxidized low-density lipoprotein</i>
<b>OxPAPC</b>	<i>Oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
<b>P300</b>	<i>ElA-associated protein of 300 kDa</i>

<b>PABP</b>	<i>Poly(A) binding protein</i>
<b>PAF</b>	<i>Platelet-activating factor</i>
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<b>pb</b>	<i>Paire de bases</i>
<b>p(dA:dT)</b>	<i>Poly(deoxyadenylic:thymidylic) acid</i>
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-derived growth factor</i>
<b>PECAM-1</b>	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
<b>PFU</b>	<i>Plaques forming unit</i>
<b>PHD</b>	<i>Prolyl hydroxylase domain</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
<b>p(I:C)</b>	<i>Poly(inosinic:polycytidylic) acid</i>
<b>PKC</b>	<i>Protéine Kinase C</i>
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptor</i>
<b>PS</b>	<i>Phosphatidyl sérine</i>
<b>PTB</b>	<i>Polypyrimidine tract binding protein</i>
<b>RAGE</b>	<i>Recepteur des advanced glycation end products</i>
<b>RA</b>	<i>Arthrite rhumatoïde</i>
<b>RANTES</b>	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted</i>
<b>RBP</b>	<i>RNA binding protein</i>
<b>RE</b>	<i>Réticulum endoplasmique</i>
<b>Rheb</b>	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
<b>Rig-i</b>	<i>Retinoic acid-inducible gene</i>
<b>RIP</b>	<i>Receptor interacting protein</i>
<b>RLR/RLH</b>	<i>Rig-i-like-receptor/Rig-i-like helicase</i>
<b>RNAi</b>	<i>ARN interférence</i>
<b>RNA pol III</b>	<i>RNA polymerase III</i>
<b>RNI</b>	<i>Reactive nitrogen intermediate</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen specie</i>
<b>RSK</b>	<i>90 kDa ribosomal S6 kinase</i>
<b>SeV</b>	<i>Sendai virus</i>
<b>shRNA</b>	<i>Short hairpin RNA</i>
<b>siRNA</b>	<i>Silencing RNA</i>
<b>SLE</b>	<i>Lupus systémique érythémateux</i>
<b>SM</b>	<i>Smooth muscle</i>
<b>SMA</b>	<i>Smooth muscle actin</i>
<b>SR</b>	<i>Scavenger receptor</i>
<b>STAT</b>	<i>Signal transducers and activator of transcription</i>
<b>STING</b>	<i>Stimulator of interferon genes</i>
<b>SUMO</b>	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
<b>T1D</b>	<i>Diabète de type I</i>
<b>TAK1</b>	<i>TGF-activated kinase 1</i>
<b>TAM</b>	<i>Tumor-associated macrophage</i>
<b>TANK</b>	<i>TRAF family member-associated NFkB activator</i>

<b>TBK1</b>	<i>Tank-binding kinase 1</i>
<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i>
<b>TESS</b>	<i>Transcription Element Search System</i>
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i>
<b>TIMP</b>	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
<b>TIR</b>	<i>Toll-interleukin-1 resistance domain</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>tPA</b>	<i>Tissue plasminogen activator</i>
<b>TRADD</b>	<i>TNFR1-associated death domain protein</i>
<b>TRAF</b>	<i>TNF receptor associated factor</i>
<b>TSC</b>	<i>Tuberous sclerosis complex</i>
<b>UPR</b>	<i>Unfolded protein response</i>
<b>U</b>	<i>Uridine</i>
<b>UTR</b>	<i>Untranslated terminal region</i>
<b>UV</b>	<i>Rayonnement ultra-violet</i>
<b>VCAM</b>	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>VHL</b>	<i>Von Hippel Lindau</i>
<b>VISA</b>	<i>Virus-inducible signaling adaptor</i>
<b>VSMC</b>	<i>Vascular smooth muscle cell</i>
<b>ZBP1</b>	<i>Z-DNA binding protein 1</i>

*Aux yeux de ma mère, aux ailes de mon père*



## Remerciements

Mon père, qui nous a quittés au cœur de mon doctorat, pour m’avoir donné le goût des sciences, des arts et de la culture. Ma mère, pour sa complicité, son écoute et son affection sans limite. Mon frère Jean-François, pour la musique et ses talents d’informaticien. Mon ami d’enfance Vincent, pour ses conseils, la flûte et le vin. Mes fidèles amis Patrick et Éric, pour tous les bons moments. Mes collègues et amis de longue date : Annie Bibeau-Poirier, pour avoir été ma complice de *bench* pendant plus de 7 ans. Louis-Dominic Tremblay, pour son sens de l’humour et la bière. Jean-François Clément, pour sa motivation et son petit côté givré. Priscilla Doyon, pour sa persévérance et le ripasso. Tasheen Wissanji, pour les 5 à 7 improvisés et le Macallan. J’aimerais également remercier Annie Douillette, Valérie Chénard, Myriam St-Amant-Verret, Monique Arts, Florence Dô, Dr Wendy van Zuijlen, Dr Kashif Aziz-Khan, Dr Céline Bouvet, Dr Liz-Ann Gilbert, différents stagiaires qui ont parsemé mon parcours (Jean-Philippe Bergeron, Étienne Pageau-Crevier, David Flashner, Patrick Labateya, Kevin Chabot, Nour El-Amine, Heba Muhay, Sophie Gobeil, Sébastien Rolland), Andrée Mathieu, Leila Andraos, Marc Pilon, Donato, Alexandre, Lucie, Gilles, Josée et le personnel administratif et de soutien de la Faculté de pharmacie. Suhaïla Raïs, Névine Nessim et Woodlie Lubin, qui m’ont aidé dans mon cheminement de chargé de cours pour le BSBP. J’aimerais spécialement remercier Dr Pierre Moreau, Dr Sylvie Marleau, Dr Sylvain Meloche, Dr Céline Fiset, Dr Darren Richard, Dr Sylvain Meloche et Dr Brian-White-Guay pour leur contribution à mon avancement académique. Tous ceux que j’oublie. Le tout ne saurait être complet sans que je remercie le Dr Marc Servant. Mon mentor m’a permis de m’épanouir à un niveau immensément supérieur à celui que j’avais atteint aux premiers cycles. Je le remercie spécialement pour son écoute, son implication dans mes projets, son intérêt vis-à-vis de mes résultats et son désir de me voir épanoui à différents niveaux : participation à des congrès internationaux, participation active à l’enseignement grâce à des charges de cours, sans oublier son côté très humain et festif qui a permis de passer en sa compagnie quelques moments inoubliables.

## **Introduction (chapitres 1 à 3)**

# 1. Vision actuelle de l'inflammation

L'inflammation est une réaction élaborée mettant en branle les cellules du système immunitaire et de nombreux médiateurs chimiques, et ce, en vue d'éliminer l'agent causal d'un dommage tissulaire et de faciliter la réparation du tissu affecté. La réponse inflammatoire est en soi une cible thérapeutique, puisque son activation chronique a des conséquences délétères associées à de nombreuses maladies. Longtemps obscurs, les causes et les mécanismes de l'inflammation commencent à être élucidés grâce à l'effort concerté de nombreux laboratoires de recherche. Il est maintenant reconnu que l'inflammation est intimement liée à la réponse immunitaire innée, première ligne de défense contre les micro-organismes pathogènes. Nous allons définir dans ce chapitre les bases physiopathologiques de l'inflammation. Nous référerons tout au long de l'ouvrage à ces mécanismes afin d'illustrer, entre autres, l'implication de différents acteurs de l'immunité innée dans les maladies inflammatoires chroniques. Nous invitons le lecteur à consulter le chapitre 3 en parallèle, qui traite exclusivement des kinases IKK et IKK-related. Le domaine de l'immunité étant un domaine très compétitif et productif, nous avons de notre mieux inséré dans l'ouvrage quelques additions récentes et éclairantes au sujet des différents mécanismes qu'emploient les cellules pour reconnaître et éliminer les pathogènes.

## 1.1 Les 4 points cardinaux de l'inflammation

Les caractéristiques macroscopiques de l'inflammation sont connues depuis l'antiquité. Nous pouvons les regrouper sous 4 points principaux, tel que l'a fait Celsius au premier siècle apr. J.-C. [1] : *rubor* (rougeur, due à la vasodilatation et l'hyperémie [2]), *tumor* (gonflement, occasionné par l'exsudation de liquide et de protéines plasmatiques dans le tissu, qui est due à une augmentation de la perméabilité membranaire [3]), *calor* (chaleur, associée à une augmentation du débit sanguin et à une activité cellulaire accrue), et finalement *dolor* (douleur, associée à la stimulation de neurones nocicepteurs par des

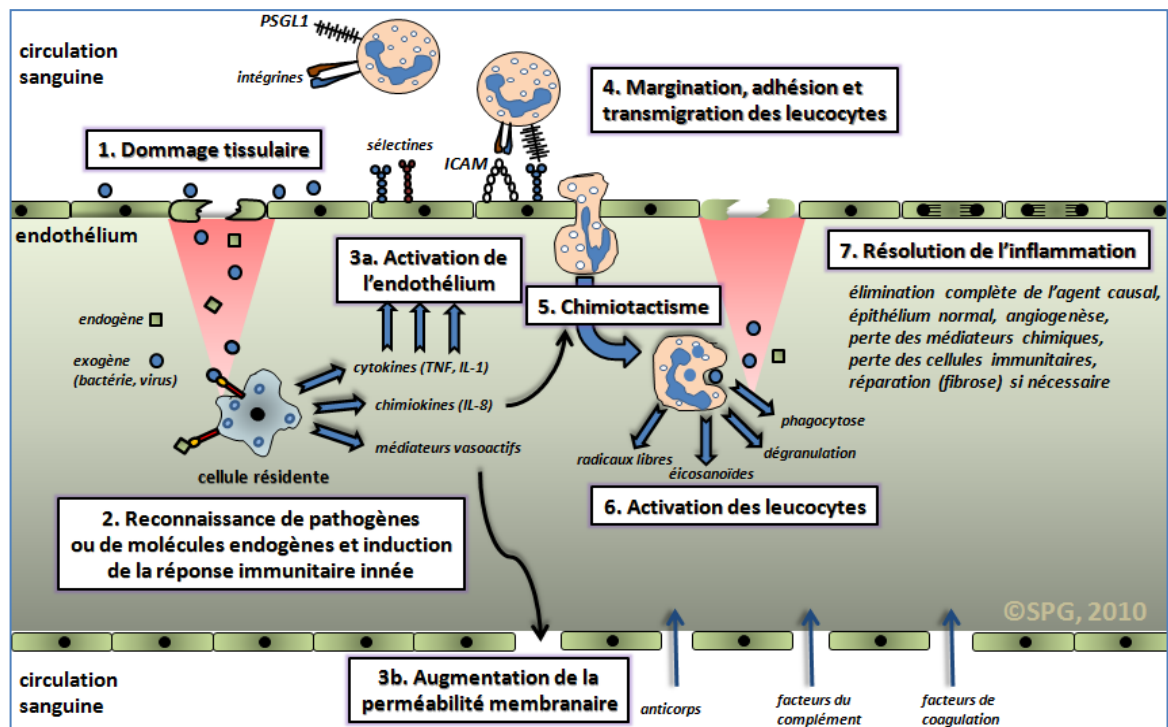
médiateurs chimiques spécifiques [4]). La fièvre, qui pourrait être contenue dans le point *calor*, implique une stimulation hypothalamique par les pyrogènes issus du foyer inflammatoire, et permettrait d'augmenter l'activité des cellules immunitaires [5]. Bien que plusieurs de ces caractéristiques présentent un intérêt diagnostique pour l'identification d'un état inflammatoire, elles n'informent pas sur l'agent causal de l'inflammation, ni ne sont représentatives des états inflammatoires des tissus internes des mammifères, notamment au niveau des vaisseaux sanguins. Afin de mieux définir la réponse inflammatoire, il est important d'en identifier les principaux médiateurs.

## 1.2 Terminologies

L'inflammation aigüe est une réponse physiologique complexe qui implique la participation des deux branches du système immunitaire : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Cette réponse de courte durée (quelques jours) vise l'élimination de l'agent causal d'un dommage tissulaire et la réparation du tissu affecté [6]. Nous l'opposons à l'inflammation chronique qui le plus souvent est la conséquence de l'incapacité à résoudre l'inflammation. Nous rencontrons fréquemment le terme de « *low-grade inflammation* » dans la littérature scientifique médicale. Ce type d'inflammation se rapporte habituellement à des perturbations systémiques (diabète de type II, hypertension, obésité), donc à des conditions chroniques où des phénomènes inflammatoires sont manifestes [7]. Un nouveau terme, la para-inflammation, se rapporte à l'inflammation liée à un tissu dysfonctionnel ou en état de stress [8]. Tout nous porte à croire que la « *low-grade inflammation* » et la para-inflammation vont de pair (section 1.5). Nous considérerons dans cet ouvrage comme "pro-inflammatoire" tout agent, médiateur ou événement qui peut initier ou promouvoir l'inflammation.

### 1.3 L'inflammation aigüe

L'inflammation aigüe présente plusieurs caractéristiques de tout processus inflammatoire en général. Cette réponse complexe fait intervenir une grande quantité de types cellulaires et de médiateurs chimiques, et l'objectif du présent ouvrage n'est pas de les énumérer tous. Nous proposons donc un mécanisme généralement accepté en insistant sur certains points précieux au raisonnement de cette thèse. Le lecteur curieux pourra consulter d'excellents ouvrages sur le mécanisme de l'inflammation [6, 9]. L'inflammation aigüe est un processus dynamique où oeuvrent en collaboration étroite le plasma et l'endothélium vasculaire. Nous avons divisé l'inflammation aigüe en 7 points principaux, tel que présenté à la figure 1. Nous aborderons ces différentes étapes tout au long de ce chapitre.



**Figure 1 : Principales étapes de l'inflammation aigüe.**

Par mesure simplificatrice nous avons identifié l'endothélium comme cible d'un dommage initial. En théorie, toutes les cellules mésenchymateuses ou épithéliales des différents organes (la peau, le foie, les intestins, le pancréas, le cerveau, etc.) peuvent être à la base de l'inflammation aigüe si elles subissent une nécrose [10-14].

### 1.3.1 Dommage tissulaire

Une coupure [10], certains types de radiations [15, 16], les brûlures [17], certains composés chimiques [18] et les cristaux d'acide urique (maladie de la goutte) [19] peuvent tous induire l'inflammation aigüe, et ce, en condition stérile (*sterile inflammation*). Comme nous le verrons, plusieurs molécules endogènes libérées par la cellule nécrotique représentent de puissants inducteurs de l'inflammation, et sont de plus en plus suspectées d'être à l'origine du développement de maladies chroniques et auto-immunes (l'athérosclérose est traitée au chapitre 2). Également, des pathogènes tels que les virus de l'herpès [20-23] et la bactérie *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) [24, 25] peuvent induire la lyse des cellules endothéliales. La lyse cellulaire induite par des pathogènes pourrait être à la base de l'apparition de maladies inflammatoires [26] et de certains cancers [27].

#### 1.3.1.1 Le type de mort cellulaire dicte la nature de la réponse immunitaire

L'induction d'une réponse inflammatoire dépend de la nature de l'agent causal, mais également de l'état de la cellule qui subit un stress ou reconnaît une source potentielle de danger. En effet, la cellule est habituellement dans un état normal, ou basal, où l'équilibre homéostatique favorise la survie cellulaire. Lorsque la cellule subit un stress, celle-ci rencontrera plusieurs destinées possibles (figure 2) : induction d'une réponse inflammatoire, de l'apoptose (une mort cellulaire programmée) ou de la nécrose (une mort induite par un stress trop grand pour pouvoir être contenu). Il est maintenant reconnu que la nécrose est un processus organisé, et l'on y réfère parfois sous le terme de nécroptose [28]. Un nouveau type de mort cellulaire a été identifié, la pyroptose, et présente des caractéristiques mixtes de l'apoptose et la nécrose [28]. Chacun de ces types de mort cellulaire aura des répercussions différentes sur l'induction de l'inflammation (figure 2). Rappelons que la majorité des tissus sont composés d'environ 10-15% de macrophages [8], phagocytes de premier plan dans les processus inflammatoires. Tel que présenté à la

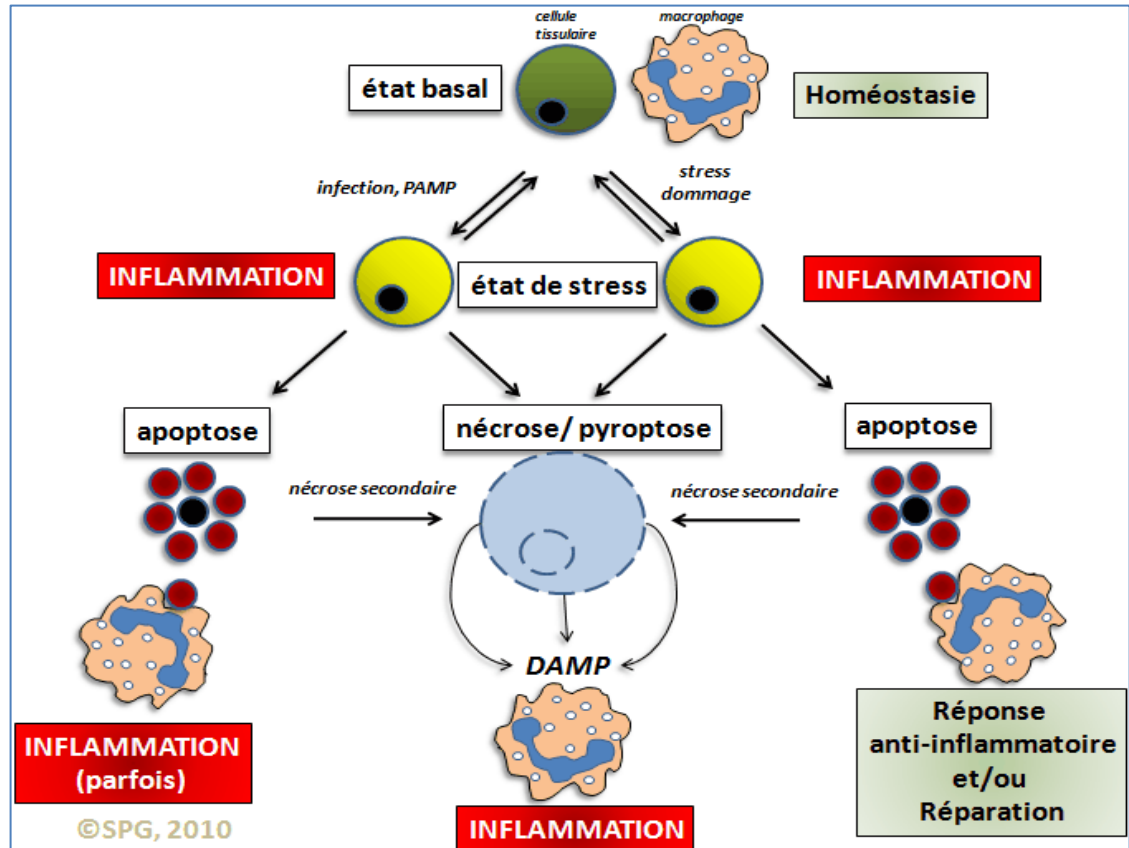
figure 2, les macrophages reconnaissent les cellules mortes et induisent une réponse immunitaire spécifique selon le type de mort cellulaire impliqué [8, 29, 30]. Le procédé par lequel les macrophages phagocytent les cellules apoptotiques est appelé «efferocytose». Il est généralement accepté que la nécrose est un phénomène pro-inflammatoire, alors que l'apoptose aurait des répercussions anti-inflammatoires [8, 31]. La pyroptose serait également pro-inflammatoire [32]. Dans une situation où les macrophages deviennent incapables de phagocyter les cellules apoptotiques, ces dernières parviennent à un état de nécrose secondaire pro-inflammatoire, qui a d'importantes répercussions dans les maladies inflammatoires chroniques [33-35]. L'induction de la réponse inflammatoire par des composés endogènes a donc lieu en condition de nécrose tissulaire, où les cellules nécrosées libèrent un contenu normalement indétectable par les leucocytes. De nombreux récepteurs ont été impliqués dans la réponse immunitaire aux composés endogènes<sup>1</sup>.

### 1.3.1.2 Implication des organelles dans la mort cellulaire et l'inflammation

Il a été montré que le stress du réticulum endoplasmique (RE), et plus particulièrement la réponse des protéines mal repliées (*unfolded protein response*, UPR), était une étape initiatrice importante de l'inflammation. La réponse UPR peut être induite, entre autres, par une modification de l'apport nutritionnel cellulaire, plusieurs cytokines, l'hypoxie, les toxines et les virus [36]. L'une des résultantes importantes d'une réponse UPR soutenue est la mort cellulaire [37, 38]. La réponse UPR serait importante dans les processus inflammatoires retrouvés dans les maladies hépatiques [39], l'obésité [36], le diabète de type II [40] et l'athérosclérose [41].

---

<sup>1</sup> Pour s'assurer qu'une molécule est bien le ligand d'un récepteur immunitaire donné, il faut s'assurer que la préparation est pure et exempte d'autres composés immunostimulants, par exemple des endotoxines. Force est de constater que ces tests ne sont pas spécifiés dans nombre d'études. (N.D.A.)



**Figure 2 : Les états cellulaires dictent la réponse inflammatoire.**

La nécrose et la pyroptose sont des conditions de mort cellulaire programmée associées à l'inflammation. Les molécules libérées (les *danger-associated molecular patterns*, DAMPs) sont immunostimulantes. Bien que l'apoptose soit habituellement un phénomène aux répercussions anti-inflammatoires, une nécrose secondaire due à une phagocytose inefficace pourra être pro-inflammatoire. Également, des données récentes suggèrent que le macrophage peut induire une réponse inflammatoire en phagocytant des cellules apoptotiques provenant de cellules infectées, et ce, en fonction des différentes molécules immunostimulantes exprimées par ces dernières [30].



La mitochondrie est reconnue comme étant la source principale des espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS)[42]. Les ROS sont des médiateurs importants de l'inflammation, et ce, à différents niveaux [43]. En oxydant des composantes intracellulaires (ADN, lipides, protéines) et extracellulaires, elles permettent la génération de molécules reconnues par le système immunitaire inné [44]. La *low-density lipoprotein* (LDL) oxydée (ox-LDL) en est le représentant le mieux caractérisé, et son implication dans l'athérosclérose est bien documentée, bien que les mécanismes qui induisent son oxydation soient quelque peu nébuleux. Par ailleurs, bien que l'intégrité de l'ADN génomique soit préservée par de nombreux mécanismes [45], une production abondante de ROS peut endommager l'ADN et ainsi mener éventuellement à la nécrose [46, 47]. Il a également été montré que la mitochondrie endommagée est source de composés immunostimulants [48].

L'autophagie est un état cellulaire programmé durant lequel la cellule digère ses organelles endommagées. Ce processus est également impliqué dans la réponse immunitaire innée puisqu'il favorise l'élimination de pathogènes [49]. Bien que ce processus de défense soit anti-inflammatoire en soi, une autophagie soutenue pourrait également mener à la mort cellulaire et contribuer de manière significative au développement de maladies cardiovasculaires [50, 51]. Finalement, nous verrons aux sections 1.3.2.3, 3.4 et 6.1.2 que plusieurs organelles détiennent également un rôle clé dans l'immunité innée proprement dite.

### **1.3.2 Reconnaissance de signaux de danger**

Nous pouvons classer les inducteurs de l'inflammation en 2 groupes : les inducteurs endogènes (provenant du soi) et exogènes (provenant du non-soi) [8]. Bien que la présence d'endotoxines (ex : le lipopolysaccharide des bactéries Gram négative, LPS) dans les préparations testées pour induire la réponse inflammatoire ait quelques fois mené vers de fausses pistes [52], il est maintenant bien reconnu que plusieurs composés non-pathogènes ou endogènes induisent la réponse inflammatoire, même en milieu stérile [53-56], de là

l'utilisation fréquente du terme « inflammation stérile ». Il appert que certaines molécules endogènes libérées par les cellules nécrotiques, ainsi que les molécules exogènes, exprimées par des micro-organismes tels que les virus, les bactéries, certaines levures et champignons peuvent être reconnues par un ou plusieurs récepteurs cellulaires de l'immunité innée [57-60] (voir tableau 1). Ces molécules représentent une source de danger potentiel, et les cellules réceptrices vont mettre en branle des programmes spécifiques en fonction de l'origine du ligand.

### 1.3.2.1 Les récepteurs de signaux de danger sont nombreux et polyvalents

Les inducteurs exogènes ne proviennent pas nécessairement de sources pathogènes. Les bactéries commensales de la flore intestinale, par exemple, peuvent induire une réponse inflammatoire lors d'un dommage à l'intestin [61]. Les allergènes [62], certains composés toxiques (la silice [63] et l'amiante [64]) sont également pro-inflammatoires. Les micro-organismes viraux et bactériens présentent des motifs moléculaires conservés (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs<sup>2</sup>) qui seront reconnus par une grande quantité de récepteurs à PAMPs, les *pathogen recognition receptors* (PRRs). Nous pouvons classer les PRRs en différentes classes selon leur localisation cellulaire respective : les PRRs membranaires (membrane plasmique et endolysosomes) et les PRRs cytosoliques. Les PRRs membranaires sont composés des *Toll-Like receptors* (TLR) [66] et des *C-Type lectine receptors* (CLR) [60]. Les PRRs cytosoliques sont composés des *Rig-i-like receptors* (RLR) [67] et des *NOD-like receptors* (NLR) [59]. Cette diversité de localisation des PRRs permet à la cellule de réagir rapidement à la présence extracellulaire ou intracellulaire des PAMPs. Par exemple, les différents intermédiaires réplicatifs viraux (des

---

<sup>2</sup> Les composants immunostimulants de l'adjuvant (en vaccination), une fois identifiés, ont été nommés modulines [65], puis le terme PAMPs a gagné en popularité au début de 3<sup>e</sup> millénaire. Cependant, l'utilisation de ce terme peut porter à confusion, puisque des motifs identiques peuvent provenir de micro-organismes non-pathogènes (bactéries commensales), et même être de source endogène (acides nucléiques). Sans prétention, nous pourrions suggérer l'usage éventuel de IMPs, pour *immunostimulatory molecular patterns*, un terme qui nous apparaît plus inclusif (N.D.A.)

acides nucléiques) pourront être reconnus par des récepteurs cytosoliques. Finalement, de nombreux composés cellulaires endogènes peuvent être reconnus par certains PRRs. Nous présentons au tableau 1 les principaux PRRs retrouvés chez les mammifères. Tel que discuté précédemment, la cellule nécrotique est une source importante de composés immunostimulants. Nous regroupons ces composés sous le terme DAMPs pour *danger-associated molecular patterns*. Nous allons discuter brièvement des différentes classes de PRRs dans les sections suivantes, puis au chapitre 3, nous nous intéresserons particulièrement à certaines kinases impliquées dans les voies de signalisation induites par ces PRRs, les kinases IKK et IKK-related.

### 1.3.2.2 Les TLRs

L'histoire de la découverte des TLRs va de pair avec celle du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1R) [66], l'une des cytokines pro-inflammatoires les plus importantes chez les mammifères. Les TLRs et l'IL-1R sont des récepteurs à un seul passage transmembranaire qui présentent une grande homologie au niveau de l'extrémité cytosolique. Nous y retrouvons le domaine homotypique *Toll/IL-1R resistance*<sup>3</sup> domain (TIR), qui permet des interactions variées avec d'autres molécules possédant ce domaine (voir figure 3). Cependant, l'ectodomaine des TLRs est complètement différent de celui de l'IL-1R (et des autres membres de la famille des récepteurs IL-1R, notamment celui de l'IL-18). Alors que l'on retrouve des domaines immunoglobulines dans l'IL-1R, les TLRs 19 à 25 présentent quant à eux des répétitions de domaines riches en leucine (LRR, leucine-rich repeats). Ces domaines hautement glycosylés forment une structure en fer à cheval [69] et servira à la reconnaissance de nombreux PAMPs (voir les exemples présentés au tableau 1).

---

<sup>3</sup> Le produit du gène N du tabac, un homologue du récepteur Toll de la drosophile impliqué dans le développement dorsoventral, ainsi que d'IL-1R, confèrait une *résistance* à l'infection au virus de la mosaïque du tabac [68].

Récepteurs	Ligands	Maladies inflammatoires <sup>4</sup>
<b>Toll-like receptors (<i>membranaires</i>)</b>		
<b>TLR2</b>	Lipoprotéines bactériennes [70] gB/gH (HCMV) [71], <b>HMGB1</b> [72], <b>Hsp60/70, gp96</b> [73]	AT [74]
<b>TLR3</b> ( <i>RE/endosomes</i> )	ARNdb [75]	Hépatites [76], RA [77], T1D [78]
<b>TLR4</b>	LPS [79], <b>HMGB1</b> [72] <b>OxPAPC</b> [80] <b>Hsp60/70, gp96, composantes de la matrice extracellulaire</b> [73]	AT [81, 82] RA
<b>TLR5</b>	Flagelline [83]	MICI [84], Vasculites [85], Fibrose kystique [86]
<b>TLR7/8</b> ( <i>RE/endosomes</i> )	ARNsb [87], imidazoquinolines [88], complexes immuns avec ADN/ARN [73]	SLE, T1D [89]
<b>TLR9</b> ( <i>RE/endosomes</i> )	ADN non-méthylé riche en CpG, squelette de sucres de l'ADN [90]	SLE [91] Asthme [92]
<b>Rig-i-like receptors (<i>cytosoliques</i>)</b>		
<b>Rig-i</b>	5'-PPP-ARNsb [93] ARN clivé par RNaseL [94], ARN riche en UA [95] Petits ARN db [96] ARN génomique viral [97], voir [98]	Anti-cancéreux [99]
<b>MDA-5</b>	Longs ARNdb [96], poly(I:C) [100], voir [98]	Anti-cancéreux [99], T1D [101]
<b>Nod-like receptors (<i>cytosoliques</i>)</b>		
<b>NOD1</b>	iE-DAP [102]	?
<b>NOD2</b>	MDP [103], ARNsb [104]	Crohn [105]
<b>NALP3/inflammasome</b>	<b>Crystaux de cholestérol</b> [106], toxines, <b>ATP</b> [107], <b>acide urique</b> [108]	AT [106], Goutte [108]
<b>C-type lectin receptors (<i>membranaires</i>)</b>		
<b>Dectines-1/2</b>	$\beta$ -Glucans (champignons)	RA [109]
<b>MINCLE</b>	Glycolipides [110], <b>SAP130</b> [111]	?
<b>LOX-1</b>	<b>oxLDL, PS, AGEs</b> , bactéries [112]	AT [113]
<b>Scavenger receptors (<i>membranaires</i>)</b>		
<b>CD36</b>	<b>oxLDL</b> [114], <b>AGEs</b> [115]	AT [116]
<b>RAGE</b>	<b>AGE s</b> [117], <b>HMGB1</b> [118]	AT [119]

**Tableau 1 : Exemples de récepteurs des immunostimulants endogènes et exogènes et leur association aux maladies inflammatoires.**

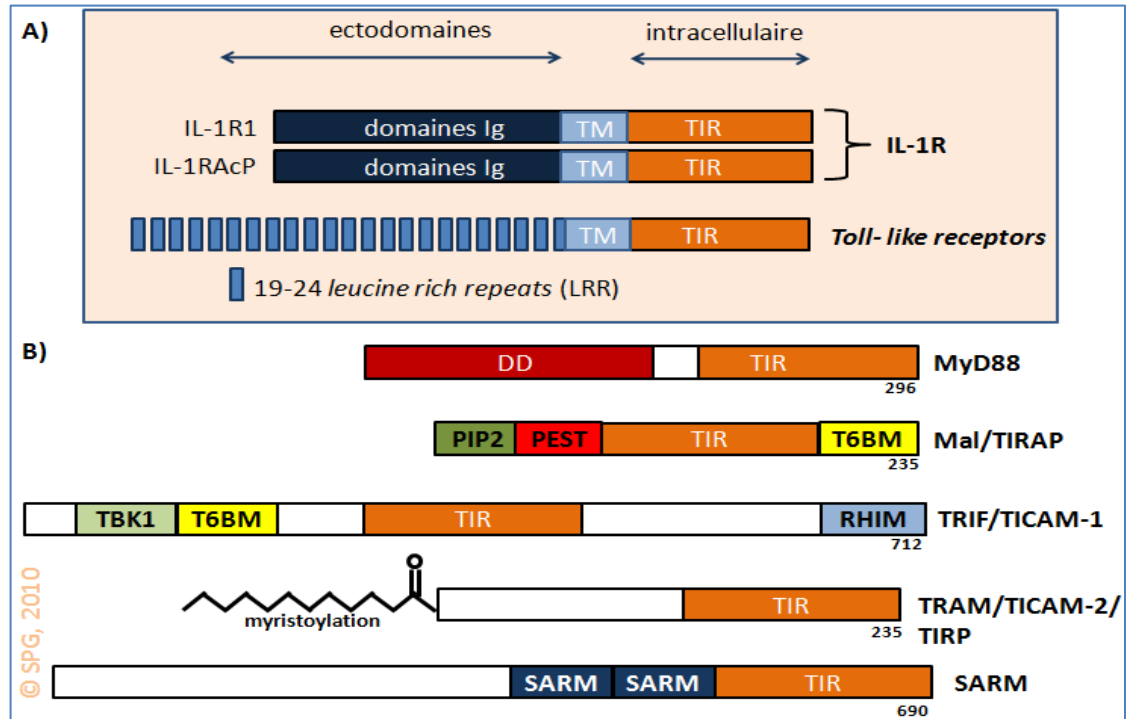
Les immunostimulants endogènes ont été identifiés par la couleur rouge (en excluant les acides nucléiques). D'autres PRRs sont présentés à la section 6.1.2, incluant les récepteurs (ou senseurs) de l'ADN double-brin. Se référer à la liste des abréviations placée en début de thèse.

<sup>4</sup> Nous n'avons considéré que des études utilisant des animaux vivants, des données cliniques ou des associations de polymorphismes. Les nombreuses données *in vitro* sont certes indicatrices de liens inflammatoires, mais des études *in vivo* approfondies sont nécessaires pour valider l'implication d'un PRR dans une maladie inflammatoire chronique. (N.D.A.)

Nous retrouvons 10 TLRs chez l'humain [66]. Alors que la majorité des TLRs homodimérisent, le TLR2 a la capacité d'hétérodimériser avec TLR10 [120], TLR1 ou TLR6 [121], ce qui augmente son nombre de ligands potentiels. Plusieurs protéines accessoires sont essentielles au fonctionnement des TLRs [122]. La protéine soluble *myeloid differentiation 2* (MD-2) [123] a été montrée essentielle à la reconnaissance du lipopolysaccharide (LPS) par le TLR4, et la molécule *cluster of differentiation 14* (CD14) augmente l'activation du TLR4 en liant le LPS et en le présentant au récepteur. De plus, des chaperonnes telles que UNC93B1 [124] PRAT4A [125] participent à la distribution cellulaire des TLRs. Rappelons que les TLR1,2,4,5,6 et 10 sont exprimés à la membrane plasmique, alors que les TLR3,7,8 et 9 sont situés dans les endolysosomes.

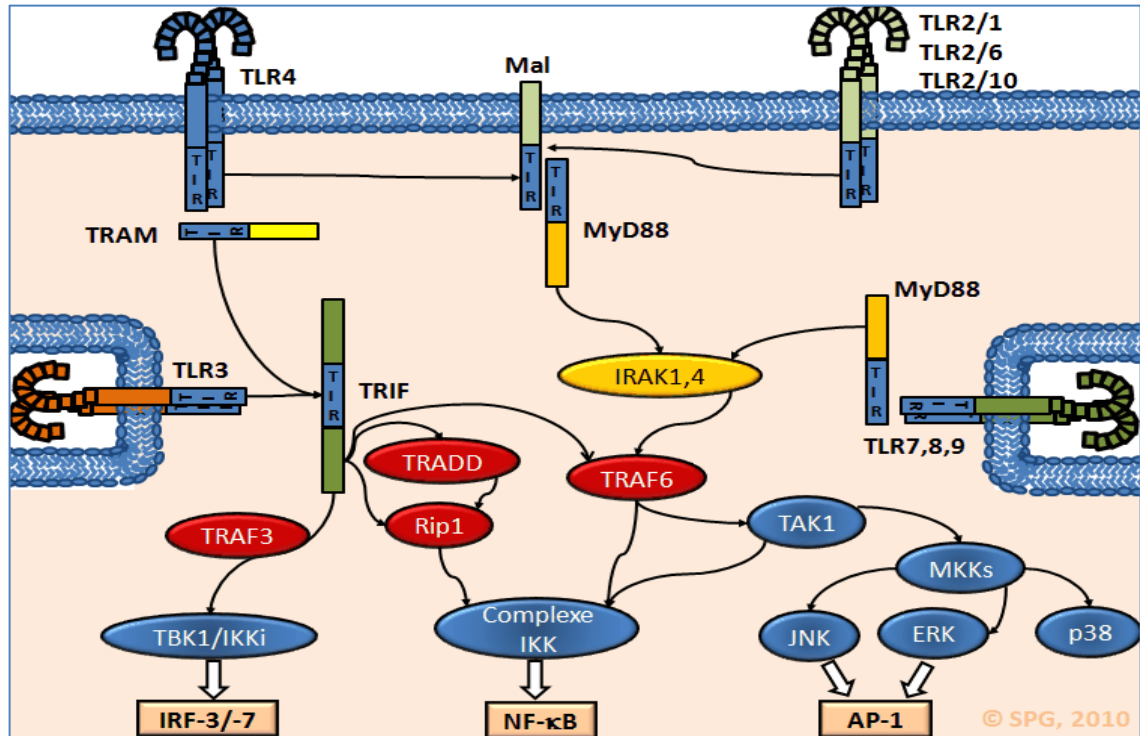
Cinq adaptateurs possèdent le domaine TIR et interagissent avec les TLRs, ce qui permet d'expliquer la spécificité des voies de signalisation induites par ces récepteurs [126] (voir figures 3 et 4). Comme nous le verrons au chapitre 3, certains de ces adaptateurs modulent l'activation de kinases impliquées dans l'activation de facteurs de transcription tels que le *nuclear factor* (NF)- $\kappa$ B (par exemple p65/RelA) et les *interferon regulatory factors* (IRFs) (par exemple IRF-3), qui modulent l'expression de cytokines et d'autres molécules impliquées dans l'inflammation et la réponse immunitaire. Ces kinases forment une famille de quatre membres regroupés dans la famille IKK (*inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B* (I $\kappa$ B) kinases) [127]. Les deux IKK d'origine sont les kinases IKK $\alpha$ /1 et IKK $\beta$ /2 [128], alors que les kinases *IKK-related* (qui leurs sont homologues) sont *Tank-binding kinase 1* (TBK1)/NAK/T2K et IKK-i/ $\epsilon$  [129-132] (chapitre 3, figure 22).

Les *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1,2/p42,p44), également induites par les TLRs [133], sont responsables de l'activation du facteur de transcription hétérodimérique AP-1 [134, 135]. Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, IRF-3 et AP-1 peuvent agir en collaboration pour moduler l'expression de gènes pro-inflammatoires [136-138].



**Figure 3 : Représentation schématique des TLRs et de leurs cinq adaptateurs.**

**A)** Le TLRs partagent une homologie de séquence avec le récepteur IL-1R pour le domaine *toll/IL-1R resistance domain* (TIR) intracellulaire. Ces récepteurs sont enchâssés dans les membranes via un domaine transmembranaire (TM). Les 2 chaînes du récepteur IL-1R sont grandement homologues, mais différentes de celles des TLRs qui présentent des domaines LRR de longueurs variables. **B)** Les cinq adaptateurs des TLRs peuvent interagir avec les TLRs via une liaison homotypique TIR-TIR. MyD88 comporte un *dead domain* (DD) impliqué dans son homodimérisation [139]. Mal est recruté à la membrane plasmique grâce à un domaine de liaison au phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) [140]. Son domaine *proline, glutamic acid, serine and threonine* (PEST) est impliqué dans sa dégradation [141]. TRIF possède un domaine d'homodimérisation *RIP homotypic interaction motif* (RHIM) [142], un domaine de liaison à TRAF6 (T6BM) [143] et un domaine de liaison à TBK1 [144]. TRAM est un adaptateur myristoylé présent aux membranes [145]. Finalement, SARM (*sterile  $\alpha$  and Heat-armadillo motifs*) est le membre le moins caractérisé. Il serait impliqué dans l'inhibition des voies dépendantes de TRIF. Nous avons inscrit le nombre d'acides aminés sous la partie C-terminale des adaptateurs. Plusieurs adaptateurs qui résultent d'un épissage alternatif n'ont pas été inclus dans cette figure : MyD88s [146], TRIS [144] et TAG [147].



**Figure 4 : Différentes voies de signalisation induites par les TLRs en fonction de leurs différents adaptateurs.**

Suite à la liaison de leurs ligands (endogènes ou exogènes, voir tableau 1), les TLRs vont recruter différents adaptateurs contenant un domaine d'interaction homotypique TIR (voir figure 3). Il existe 2 voies de signalisation principales, les voies dépendantes de MyD88, et les voies dépendantes de TRIF (ou indépendantes de MyD88) [148]. TLR3 est le seul TLR qui ne recrute pas directement ou indirectement MyD88. Seuls les TLRs 3 et 4 ont la capacité d'activer les kinases TBK1 et IKK- $\alpha$ , impliquées dans l'activation du facteur de transcription IRF-3 (chapitre 3). Chez certains types cellulaires spécialisés, comme les cellules dendritiques plasmacytoïdes, l'engagement des TLR7-9 mène à l'activation d'IRF-7 (non montré) [149, 150]. IRF-3 [151], IRF-7 [152] et IRF-5 [153] (non montré) peuvent tous participer à la transcription de gènes pro-inflammatoires. Nous verrons plus en détail au chapitre 3 la séquence d'activation du complexe IKK, impliquant TRAF6, et la séquence d'activation des kinases IKK-related, impliquant TRAF3. Les TRAFs (*TNF receptor associated factors*) ont un rôle important dans de nombreuses maladies [154]. Finalement, les TLRs ont la capacité d'activer les trois MAPK. P38 a un rôle très important dans l'inflammation [155], notamment en induisant l'expression de la cytokine TNF- $\alpha$  par des processus traductionnels [156], en participant au chimiotactisme [157, 158] et en modulant l'expression de différentes protéines pro-inflammatoires [159-161].

Les TLRs et leurs adaptateurs sont liés au développement de nombreuses maladies inflammatoires (voir tableau 1). L'expression de certains TLRs est augmentée dans l'athérosclérose [162], l'arthrite rhumatoïde [163], le diabète de type 1 [164] le psoriasis [163], la fibrose kystique [165], pour n'en nommer que quelques-unes. TLR3 [166-168] et l'adaptateur TRIF [169], par exemple, sont modulables par des processus transcriptionnels. De plus, certains polymorphismes des TLRs sont associés à des maladies inflammatoires [170], au choc septique [171] et au cancer [172, 173]. D'autres polymorphismes ont des rôles protecteurs [174]. Il est donc clair que les TLRs ont un rôle important dans l'établissement de maladies inflammatoires chroniques.

### 1.3.2.3 Les RLRs

Les 3 RLRs cytosoliques identifiés à ce jour forment une famille d'hélicase DExD/H (un motif conservé où x est n'importe quel acide aminé) à ARN spécialisées dans la reconnaissance d'ARN double brin (ARNdb) ou simple brin (ARNsb), et à la mise en branle d'une réponse antivirale [175]. Cette famille est composée de *retinoic acid inducible gene 1* (Rig-i), *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) et *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2). Rig-i et MDA5 possèdent des domaines CARD (*caspase activation and recruitment domain*), alors que LGP2 n'en possède pas [176]. Cependant, LGP2 partage avec Rig-i et MDA5 la capacité de lier les ARNdb, et peut induire ou réprimer l'activation des réponses antivirales de MDA5 et de Rig-i [176, 177]. Les ligands de Rig-i et MDA-5 ont été inscrits dans le tableau 1. Nous avons présenté les voies de signalisation induite par les RLRs à la figure 5.

Il existe peu d'évidences associant les RLRs aux maladies inflammatoires. MDA5 pourrait être impliqué dans la pathologie du diabète de type 1 [178], puisque des polymorphismes de ce gène confèrent une certaine protection [101]. Il existe de nombreux polymorphismes de Rig-i, dont certains modifient drastiquement sa fonction [179]. De plus, l'expression de Rig-i et de MDA5 est induite dans des cas de maladie pulmonaire



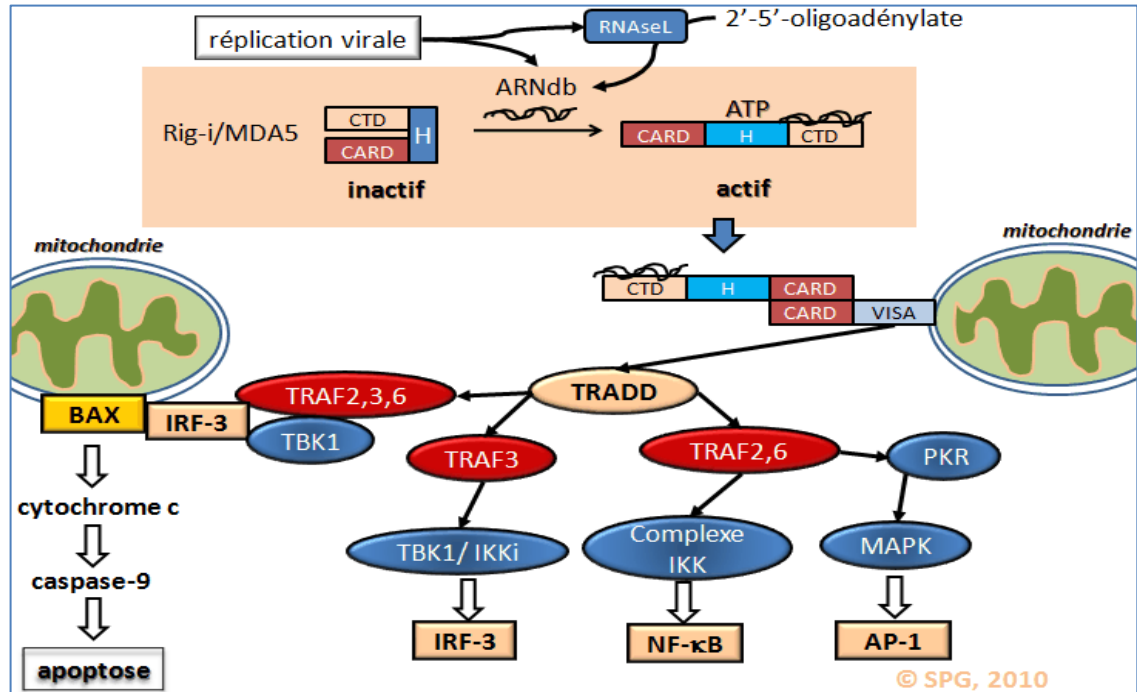
obstructive chronique [180]. En dépit de la régulation de Rig-i par l'acide rétinoïque, la régulation transcriptionnelle de ces RLRs n'est pas bien caractérisée. Nous savons cependant que Rig-i et MDA5 sont induits par les interférons de type I [175]. Nous pouvons observer à la figure 5 que les RLRs induisent l'activation des facteurs de transcription IRF-3, NF- $\kappa$ B et AP-1, et que ceux-ci peuvent être impliqués dans l'inflammation, tel que vu précédemment. Cependant, le rôle pro-inflammatoire des RLRs n'est pas bien compris. En effet, il a été montré que le TLR3 était impliqué dans l'induction de gènes inflammatoires lors d'une infection par le virus du sarcome de Kaposi, alors que Rig-i exerçait davantage un effet inhibiteur [181]. Par leur rôle pro-apoptotique (voir la légende de la figure 5), les RLRs sont considérés comme des suppresseurs de tumeur potentiels [99]. Par exemple, la surexpression de Rig-i dans des cellules cancéreuses entraîne l'apoptose et la libération de cytokines pro-inflammatoires [182]. Fait intéressant, il a été montré que Rig-i induisait la migration cellulaire [183], notamment en modifiant le cytosquelette d'actine [184]. Comme nous le verrons dans ce chapitre, la migration cellulaire détient un rôle important dans l'ensemble des phénomènes inflammatoires.

#### 1.3.2.4 Les NLRs et les inflammasomes.

Les NLRs, des récepteurs cytosoliques récemment découverts et impliqués dans l'immunité, forment une famille de 23 membres aux fonctions diverses [185]. Les NLRs possèdent, tout comme les TLRs, une extrémité C-terminale LRR. Cependant, alors que les LRRs sont connus pour lier directement des ligands et entraîner l'activation des TLRs, beaucoup de NLRs semblent être activés par des mécanismes indirects [185] (voir figure 6). Les NLRs possèdent également un domaine central *nucleotide-binding oligomerisation* (NOD)<sup>5</sup> qui est semblable au domaine *ATP-binding cassette* (ABC) [187].

---

<sup>5</sup> Également appelé NACHT (NAIP,CIIA,HET-E,TP1), pour désigner une nouvelle famille de NTPases partageant ce domaine [186].



**Figure 5 : Voies pro-inflammatoires induites par les RLRs.**

Rig-i et MDA5 ont la capacité de lier différents ARNs viraux, notamment issus de processus réplicatifs [188], tels que l'ARNdb. La RNaseL, induite par les interférons (IFNs), génère des ARNdb à partir du 2'-5'-oligoadénylate endogène, ce qui augmente l'activité des RLRs [94]. Suite à la liaison des ARNs au niveau de leur extrémité C-terminale (CTD), les NLRs changent de conformation, lient l'ATP et exposent leur domaine CARD [189]. Les NLRs interagissent ainsi avec l'adaptateur VISA<sup>6</sup> (*virus-induced signaling adaptor*), un adaptateur CARD qui est situé à la membrane externe des mitochondries. VISA recrute *TNFR1-associated death domain protein* (TRADD), une molécule qui orchestre un véritable « *innateosome* » en induisant d'une part l'activation de NF- $\kappa$ B via Rip1 et FADD (non montrés), et d'autre part l'activation de IRF-3 via TRAF3 [175, 193]. La protéine kinase R (PKR), qui est induite par les IFNs tout comme la RNaseL, serait recrutée par TRAF6 et induirait l'activation des MAPKs par une voie VISA dépendante [194]. Il a également été montré que PKR était nécessaire à l'activation de IRF-3 dans cette voie (non montré) [195]. L'effet pro-apoptotique de l'activation de la voie Rig-i/MDA5 a récemment été expliqué par un nouveau mode d'induction de l'apoptose. En effet, IRF-3 était connu pour pouvoir induire l'apoptose [196], notamment par son activité transcriptionnelle [197-199]. IRF-3 est maintenant reconnu pour activer la protéine BAX via un domaine BH3, ce qui entraîne la libération du cytochrome c de la mitochondrie et l'apoptose [200].

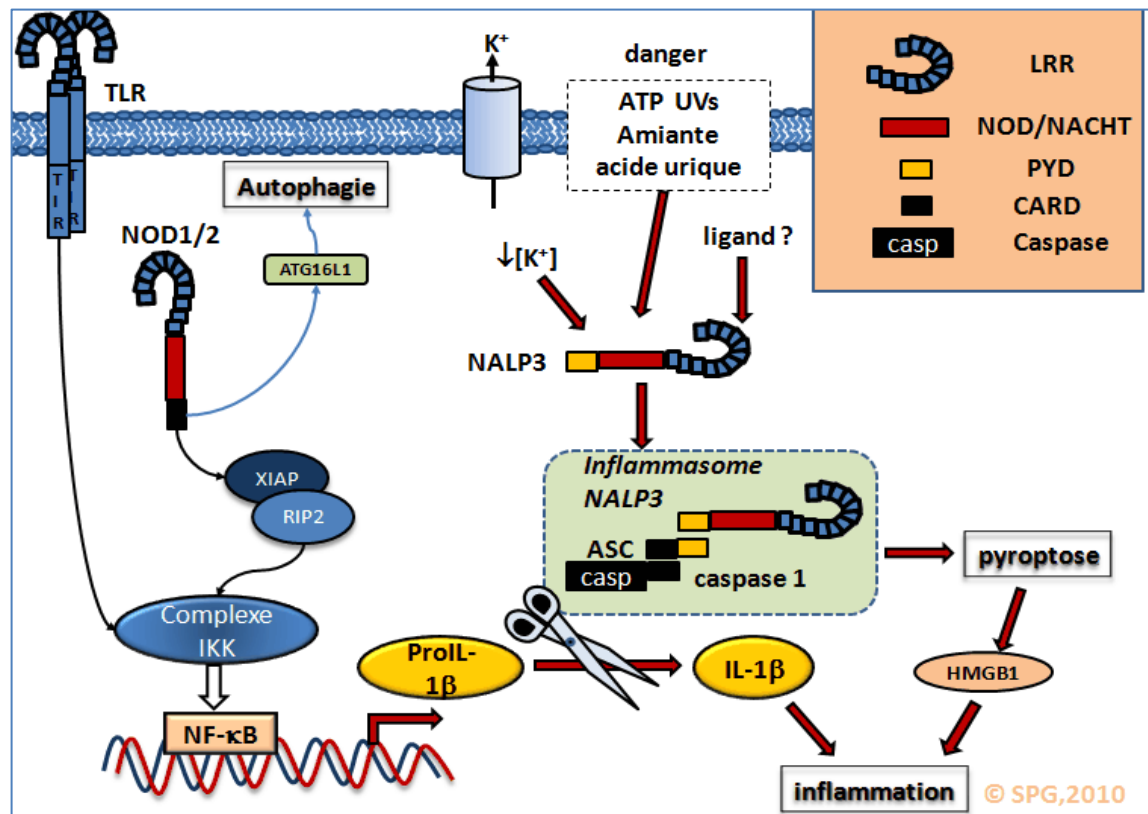
<sup>6</sup> Découvert par 4 groupes indépendants, VISA est également appelé Cardif (*CARD adaptor inducing IFN- $\beta$* ) [190], MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*) [191], IPS-1 (*IFN- $\beta$  promoter stimulation 1*) [192].

L'extrémité N-terminale des NLRs est variable et contient des domaines *caspase recruitment and activation domain* (CARD) [201], des domaines Pyrin (PYD) [201] ou des domaines *baculovirus inhibitor of apoptosis repeat domain* (BIR) [202], impliqués dans la mise en branle de signalisations variées.

Nous illustrons et expliquons à la figure 6 les quelques voies de signalisation induites par les NLRs. Les NLRs sont de puissants inducteurs d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18, deux cytokines pro-inflammatoires (section 1.4), et procèdent par des mécanismes transcriptionnels et non-transcriptionnels. Certains NLRs modulent l'expression de proIL-1 $\beta$  via l'activation de NF- $\kappa$ B [203], alors que d'autres ont la capacité d'induire un complexe multiprotéique nommé inflammasome, qui module l'activation de la caspase-1/ICE [204]. La caspase-1 est spécifiquement impliquée dans la maturation d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 [205]. Les NLRs, bien que connus depuis peu, sont déjà liés à de nombreuses maladies inflammatoires. NOD2, par exemple, un NLR qui ne forme pas d'inflammasome, induit le processus d'autophagie et est impliqué dans le développement de la maladie de Crohn [206, 207]. L'inflammasome NALP3, l'un des mieux caractérisés [185], serait associé au développement de la maladie de la goutte [208] et de l'Alzheimer [209]. Finalement, AIM2, un nouveau récepteur de l'ADN cytosolique<sup>7</sup>, a la capacité de former un inflammasome [210], et est peut-être impliqué dans le SLE [211].

---

<sup>7</sup> Il existe de nombreux senseurs de l'ADN. Au moment de la publication de l'article #1 présenté dans cette thèse, aucun récepteur de l'ADN n'était identifié hormis le TLR9. Puisque de nombreux récepteurs sont maintenant identifiés, nous les aborderons dans la discussion de cette thèse (section 6.1.2).



**Figure 6 : Voies pro-inflammatoires induites par les NLRs.**

Les NLRs sont nombreux et polyvalents. Nous ne présentons ici que deux exemples bien documentés. Les NOD1/2 reconnaissent des composantes bactériennes qui se retrouvent dans le cytosol. Via leur domaine CARD, ils interagissent avec RIP2 (RICK/CARD3/CARDIAK/RIPK2) [212]. XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) lie RIP2 et est important dans l'induction de NF-κB [213]. RIP2 serait également impliqué dans l'activation de MAPKs (non montré) [214, 215]. L'ubiquitination de RIP2 mènerait au recrutement de TAK1 [216], une protéine impliquée dans l'activation de NF-κB et des MAPKs [217]. Les NOD1/2 sont également impliqués dans l'autophagie en induisant le recrutement membranaire de la protéine ATG16L1 [218]. Le NLR NALP3 est quand à lui activé par différents signaux de danger par des mécanismes peu caractérisés [185], mais qui impliqueraient la production ROS [219]. Suite à son activation, NALP3 forme un inflammasome avec la protéine ASC et la caspase-1 [220]. Les TLRs et les NODs agissent en synergie avec les inflammasomes, puisque l'induction transcriptionnelle de proIL-1β par ces derniers alimente la caspase-1 qui se charge de sa maturation en IL-1β [221]. Les inflammaosomes seraient peut-être impliqués dans le processus de pyroptose [185], une mort programmée pro-inflammatoire qui permettrait la libération de molécules endogènes immunostimulantes telles que HMGB1.

### 1.3.2.5 Les ligands modifiés chimiquement

De nombreuses molécules endogènes sont modifiées chimiquement et de manière non-enzymatique en conditions pathologiques. Différents produits sanguins sont glycosylés (ou glyqués) de manière anormale chez les diabétiques (*advanced glycation end products*; AGEs) [222]. Également, les LDL, qui assurent le transport des acides gras et du cholestérol aux tissus, sont oxydées (ox-LDL) chez les patients atteints de diverses maladies cardiovasculaires [223] et d'obésité abdominale [224]. Les macrophages, ainsi que d'autres types cellulaires, sont dotés de récepteurs pour ces molécules modifiées [225, 226]. Le récepteur *scavenger* CD36, par exemple, en plus d'assurer la prise de lipides [227], induit une signalisation pro-inflammatoire suite à sa reconnaissance des ox-LDL [228]. De plus, il a récemment été montré que le CD36 était un corécepteur de l'hétérodimère TLR2-TLR6 [229], ce qui ouvre une nouvelle ère de recherche sur l'origine des maladies inflammatoires chroniques telles que l'athérosclérose et l'Alzheimer. Le récepteur RAGE (récepteur des AGEs) induit également une signalisation pro-inflammatoire et fait un lien important entre le diabète et le développement de l'athérosclérose [230]. Nous n'aborderons pas en détail durant ce travail les signalisations induites par les récepteurs CLR et par les récepteurs *scavengers*<sup>8</sup>. Cependant, nous y référerons parfois au chapitre 2 lorsque nous discuterons de l'athérosclérose.

### 1.3.3 Modifications de l'endothélium en conditions inflammatoires

En réponse aux stress mentionnés dans les sections précédentes, les vaisseaux sanguins, notamment l'endothélium, subissent des modifications temporaires et réversibles qui vont favoriser la réponse inflammatoire. L'un des points saillants de l'inflammation est « l'activation de l'endothélium », que l'on peut séparer en deux points majeurs : 1- une augmentation de la perméabilité de l'endothélium, et 2- l'expression induite de molécules

---

<sup>8</sup> Nous référons le lecteur à quelques bons articles de revue sur les CLR [60, 112] et sur les récepteurs *scavenger* [231].

d'adhésion impliquées dans le recrutement de leucocytes [6]. L'endothélium activé est également producteur de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, tel que nous le verrons dans une section ultérieure.

### 1.3.3.1 Augmentation de la perméabilité de l'endothélium

L'endothélium représente en conditions normales une barrière physique contre l'invasion de cellules ou de composés plasmatiques. Il a été montré que les cellules endothéliales peuvent subir différentes modifications structurales qui mèneront à une augmentation de la perméabilité, un processus favorisant les échanges entre le compartiment plasmatique et le compartiment tissulaire [3]. Différents médiateurs tels que l'histamine [232], la sérotonine [233], la trombine [234], le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [235, 236], le *platelet-activating factor* (PAF) [237], certains leucotriènes [238], l'oxyde nitrique (NO) [239] et les ROS [240], libérés par de nombreux types cellulaires, peuvent efficacement favoriser ces processus. Quelques mécanismes sont à l'origine de la modification de l'endothélium : le relâchement des jonctions adhérentes telles que les cadhérines, la formation de canaux intercellulaires (*gaps*) et la formation de vésicules (caveolae et organelles vésiculo-vacuolaires) qui vont migrer de part et d'autre des cellules endothéliales [241]. La résultante de l'augmentation de la perméabilité membranaire est l'exsudation, caractérisée par l'accumulation de fluides, de protéines et de cellules dans les tissus [6]. Les protéines du complément [242, 243] et les immunoglobulines [244] auront ainsi accès au foyer inflammatoire et permettront la clairance tissulaire d'agents causaux et de cellules apoptotiques. Les composantes de la cascade des kinines [245], du système fibrinolytique [246] et de la cascade de coagulation [247] auront également des rôles pro-inflammatoires variés [6].

### 1.3.3.2 Expression induite de molécules d'adhésion

Les cellules endothéliales réagissent aux nombreux médiateurs de la réponse inflammatoire en induisant l'expression de molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement de leucocytes sanguins (figure 1). Il est intéressant de constater que plusieurs hormones, cytokines et agents pathogènes ont la capacité d'induire l'expression de ces molécules d'adhésion, et que leur induction dépend de facteurs de transcription spécifiques (tableau 2). Une exception notable est la P-sélectine (GMP-140), impliquée dans le roulement des leucocytes [248] et des plaquettes [249], puisqu'elle est exprimée suivant la dégranulation des corps de Weibel-Palade par un mécanisme non-transcriptionnel. Le recrutement de leucocytes se divise en 3 étapes bien caractérisées, 1- le roulement à la surface de l'endothélium (qui implique les sélectines) 2- l'adhésion ferme (qui implique la E-sélectine, ainsi que ICAM-1 et VCAM-1, de la famille des immunoglobulines), puis 3- la transmigration à travers l'endothélium (qui implique notamment PECAM-1) [6]. Les neutrophiles représentent le type majeur de cellules immunitaires recrutées lors de l'inflammation aiguë. Cependant, les cellules endothéliales vont également recruter des monocytes [250], des lymphocytes B [251] et T [252] ainsi que d'autres leucocytes. Nous pouvons affirmer que le neutrophile est caractéristique de l'inflammation aiguë, alors que le macrophage est caractéristique de l'inflammation aiguë tardive et de l'inflammation chronique [6]. Le neutrophile ayant une courte durée de vie, celui-ci sera progressivement remplacé par le macrophage, qui d'ailleurs se chargera de la phagocytose des neutrophiles apoptotiques [253].

<i>Molécules d'adhésion endothéliales</i>	<i>Inducteurs</i>	<i>Facteurs de transcription</i>	<i>Ligands des leucocytes</i>	<i>Cellules recrutées</i>	<i>Références</i>
<b>P-sélectine (GMP-140)</b>	Histamine, Thrombine, PAF, TNF $\alpha$ , AngII, Hypoxie	Régulation non-transcriptionnelle	ESL-1 PSGL-1	Neutrophiles Monocytes Lymphocytes Plaquettes	[6, 249, 254-256]
<b>E-sélectine (ELAM-1)</b>	TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS, AGEs, Thrombine, <i>C. pneumoniae</i> , Poly(I:C), AngII	NF- $\kappa$ B AP-1, c-Jun HOXA9 KLF2	PSGL-1 ESL-1	Neutrophiles, Monocytes cellules T	[6, 257-267]
<b>ICAM-1</b>	TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , AngII, LPA, Poly(I:C), Thrombine, Hypoxie	NF- $\kappa$ B, NFAT AP-1, c-Jun	CD11 LFA-1 Mac-1	Leucocytes	[268] [6, 260, 266, 269-272]
<b>VCAM-1</b>	TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , (TNF $\alpha$ +IFN $\alpha$ ), Thrombine, AngII, Poly(I:C), CoCl <sub>2</sub>	NF- $\kappa$ B, STAT1 IRF-1 c-Jun, KLF2	VLA4 LPAM-1	Monocytes Lymphocytes Eosinophiles	[268] [6, 260, 262, 263, 269, 270, 273-275]

**Tableau 2 : Molécules d'adhésion endothéliales induites lors de l'inflammation.**

Se référer à la liste des abréviations placée en début de thèse.

### 1.3.4 Les leucocytes et le destin de l'inflammation

Les leucocytes recrutés au foyer inflammatoire ont pour objectif d'éliminer les agents infectieux [276, 277], les cellules mortes [278] et de contribuer à la réparation du tissu endommagé [279, 280]. Les leucocytes vont migrer dans le tissu selon un gradient d'agents chimio-attractifs [281]. Les chimiokines sont des cytokines spécialisées dans la migration cellulaire (section 1.4.2). Des composés exogènes tels que les peptides N-formyle provenant de bactériens dégradées (mais également des mitochondries [48]) sont également chimio-attractifs [282]. De plus, des agents chimio-attractifs variés, par exemple l'IL-8 [283], vont mener à « l'activation des leucocytes », que nous allons décrire sous peu. Mentionnons que le TNF- $\alpha$  [284, 285] et l'hypoxie [286-289] vont également jouer des rôles importants dans l'activation des leucocytes. L'hypoxie, qui est un état de déplétion en



oxygène moléculaire, est présente lors de nombreux processus inflammatoires [289-291]. Nous étudierons à la fin de ce chapitre le rôle de l'hypoxie dans l'inflammation et le cancer (section 1.6).

Suite à la reconnaissance de particules opsonisées, les leucocytes vont englober ces dernières dans des vacuoles phagocytiques spécialisées dans la dégradation par des mécanismes impliquant les ROS, le lysozyme ainsi que d'autres molécules anti-microbiennes [6]. La reconnaissance de certaines molécules d'adhésion endothéliales [292], les agents chimio-attractifs et la phagocytose [293] sont tous des mécanismes qui induisent l'activation des leucocytes. Le leucocyte activé est une entité autant dangereuse pour les pathogènes que pour l'hôte [294]. En effet, en libérant activement des enzymes lysosomiales, des éioconanoïdes pro-inflammatoires et des ROS, le leucocyte contribue de façon significative à l'établissement de dommages collatéraux variés : destruction de l'endothélium, de la matrice extracellulaire et de tissus mésenchymateux. En conditions inflammatoires, les neutrophiles, puis les macrophages sont désactivés par apoptose ou par un retour à la circulation sanguine [295] ou lymphatique [296, 297]. La présence de particules impossibles à phagocyter, des infections récurrentes et certaines maladies génétiques [298] vont contribuer à une activation soutenue des leucocytes qui portera l'inflammation à un stade chronique [6, 8]. La nécrose tissulaire en elle-même contribuera également à l'inflammation chronique [299].

La résolution de l'inflammation est complexe et ne sera pas abordée de manière détaillée dans cet ouvrage. Nous avons mentionné à la figure 1 (voir le point 7) quelques mécanismes de réparation tissulaire. Il est notable que les foyers d'inflammation chronique présentent des tentatives de résolution de l'inflammation. L'angiogenèse, par exemple, est présente dans les plaques athéromateuses avancées [300-302], mais semble désorganisée et contribuerait de manière significative à la rupture de la plaque [303, 304] (section 2.2.3.4). L'angiogenèse est également présente dans les lésions d'arthrite rhumatoïde [305], dans les tissus adipeux des souris obèses [306] et dans les maladies chroniques du foie [307].

## 1.4 Les cytokines sont des modulatrices majeures de l'inflammation

Il existe chez l'humain un nombre considérable de cytokines<sup>9</sup>. Nous ne pourrions les énumérer toutes dans le présent ouvrage<sup>10</sup>. Nous allons nous intéresser à certaines cytokines pro-inflammatoires reconnues pour être impliquées dans le développement de maladies inflammatoires (tableau 3).

Plusieurs médiateurs de l'inflammation ont été introduits jusqu'à maintenant. Les composants sanguins du système du complément et la voie de coagulation, les amines vasoactives, les éicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes), le PAF, le NO et les ROS ont tous une implication décisive dans l'inflammation [6]. De nombreux médiateurs de l'inflammation sont les cibles de thérapies inflammatoires présentes ou futures<sup>11</sup>. L'acide acétyl salicylique et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (NSAIDs), par exemple, ciblent les enzymes cyclo-oxygénases (COX), impliquées dans la génération d'éicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique [314, 315]. Cependant, l'utilisation prolongée de différents composés anti-inflammatoires exerce une certaine toxicité qui n'est pas souhaitable pour les maladies inflammatoires chroniques [313, 316]. L'usage des thérapies anti-cytokines s'est montré efficace dans les traitements de maladies chroniques telles que le diabète de type I, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn, le psoriasis et la sclérose multiple [313]. De plus, il a été montré que le développement de maladies cardiovasculaires était étroitement lié à plusieurs maladies inflammatoires chroniques non-vasculaires [317, 318]. Les traitements anti-cytokines s'avèrent désormais efficace pour diminuer l'incidence de l'athérosclérose et des maladies liées [319, 320].

---

<sup>9</sup> Le terme cytokine a été introduit par Stanley Cohen en 1974 et provient de *cyto* (cellule) et *kinin* (hormone). [308].

<sup>10</sup> Le lecteur pourra consulter certains ouvrages et articles de revues importants sur les cytokines : [309-312].

<sup>11</sup> Charles A Dinarello, un grand nom du domaine des cytokines, notamment à cause de sa contribution à la caractérisation d'IL-1, a écrit une revue très intéressante et accessible sur les thérapies anti-inflammatoires [313].

	Mécanismes d'induction	Exemples de cellules sources	Exemples de rôles dans l'inflammation	Exemples de maladies inflammatoires
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Pro-TNF clivé par des MPs/TACE [321] Transcription [322] Traduction [323]	M $\phi$ , LT [324], EC [325] SM, LB, NK, mastocytes [326]	Ac N, + Adhésion Vasodilatation/perméabilité Coagulation [324]	Cr [327, 328], SLE [329]
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Caspase-1 (inflammasome) [330] HIF-1,2 [331]	M $\phi$ ,LT/B, DC, EC, SM [326]	Ac NK Prolifération EC, SM [326]	SLE[329, 332], AT[326]
<b>IL-6</b>	NF- $\kappa$ B, NF-IL6 [333] AP-1[334]	M $\phi$ , SM, EC [335],LT, F, cellules stromales [326]	Réponse de la phase aigüe, Prolifération [326]	Cr [328],AT [336],SLE [337]
<b>IL-18</b>	Caspase-1 (inflammasome) [330] Transcription par l'hypoxie [338]	M $\phi$ [339], EC, SM [326]	Induction de IFN $\gamma$ + cytotoxicité NK, LT[339] Migration SM [340] Prolifération SM[341]	SLE, AT [342]
<b>IL-8</b>	NF- $\kappa$ B, NF-IL6 [333] HIF-1,2 [331] AP-1 [343]	M $\phi$ [344], EC [326]	Cx N, LT, monocytes[326]	AT[344] ,SLE[329]
<b>MCP-1</b>	NF- $\kappa$ B [345] IRF-3[346]	SM,M $\phi$ [344]Tumeurs [347]	Cx Mo, LT, NK [348] +MMPs M $\phi$ [349] Perméabilité EC [350] + VSMCs [351]	AT [352-354], RA [355], Cr [356] ,SLE [337]
<b>RANTES</b>	IRF-3, IRF-7, NF- $\kappa$ B [136] Stat-1 [357] , Stat-3 [358]	LT, plaquettes, M $\phi$ et d'autres [359]	Cx LT, DC, NK, et d'autres [359] + MMPs monocytes [360]	Cr [356],AT [344]
<b>IP-10</b>	IRF-3, ISGF3 [361] NF- $\kappa$ B [362]	M $\phi$ ,LT,EC, SM [344]	Cx LT, monocytes, éosinophiles[363]	AT [344], RA, SLE [363]
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	ATF3/JUN [364]	NK, LT/B, DC, M $\phi$ [365]	Ac M $\phi$ , LT, NK + Molécules d'adhésion + cytokines [365] (Prolifération, Migration des SM) [326]	AT [366]
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	IRF-7, IRF-3.	pDCs	Ac LT CD4+ [367] sensibilise les APC [368]	AT [367, 368]

**Tableau 3 : Aperçu de la diversité des cytokines pro-inflammatoires et de leurs associations aux maladies inflammatoires chroniques.**

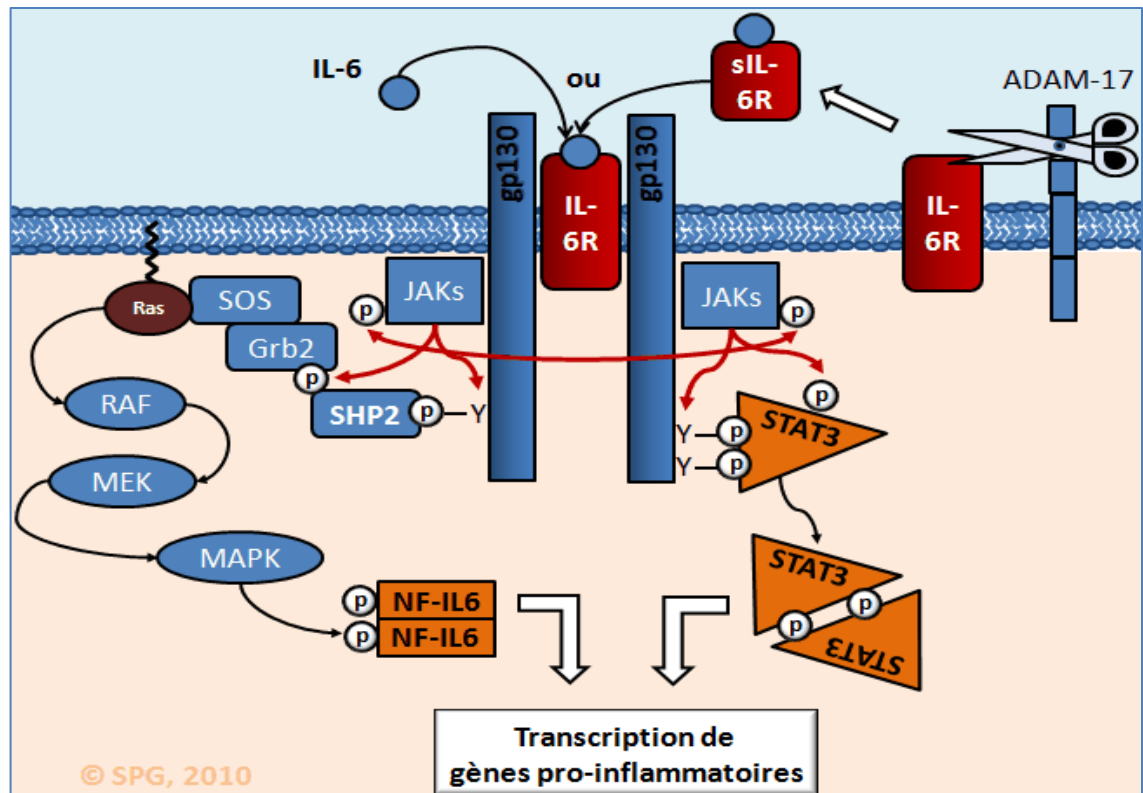
Abréviations : MPs : métalloprotéases; EC : cellules endothéliales; SM : cellules musculaires lisses vasculaires; F : fibroblastes; M $\phi$ : Macrophages; N : neutrophiles; LT/B : Lymphocytes T/B; DC : cellules dendritiques ; pDC : cellules dendritiques plasmacytoïdes; NK : cellules *natural killer* (NK) PL : plaquettes; APC : cellules présentatrices d'antigènes; Cx : chimio-attraction ; Pr : prolifération; Adhésion : molécules d'adhésion; Ac : activation; + : stimulation; AT : athérosclérose; RA : arthrite rhumatoïde; SLE : lupus systémique érythémateux; Cr : cancer.

Rappelons que l'efficacité des statines à diminuer le taux de cholestérol sanguin [369, 370], exemplifiée par un usage abondant dans le monde médical, ne parvient pas à prévenir 70% des manifestations de l'athérosclérose [371]. Ainsi, la recherche sur la régulation et sur le mécanisme d'action des cytokines s'avère prometteuse dans le traitement de maladies inflammatoires variées.

Nous pouvons associer les cytokines à 16 classes fonctionnelles selon leurs rôles principaux [310]. Cependant, les cytokines sont si polyvalentes qu'elles peuvent parfois se retrouver dans plus d'une classe. Pour les besoins de cette thèse, et avec prudence, nous pourrions classer les cytokines en fonction de leur rôle dans l'inflammation : 1- pro-inflammatoires, et 2- anti-inflammatoires. Nous allons donc discuter brièvement de certaines cytokines pro-inflammatoires que nous avons analysées dans nos articles de recherche. Nous présentons au tableau 3 quelques candidats particulièrement importants dans le cadre de nombreuses maladies inflammatoires chroniques. Nous discutons davantage de la régulation et du rôle des différents types d'interférons aux sections 2.2.3.3, 3.3.1 et 3.3.3.

### **1.4.1 IL-6**

L'IL-6, avec le TNF [324] et l'IL-1 [372] forme ce qui est parfois nommé la « triade inflammatoire » [373]. En effet, ces cytokines sont toujours libérées des sites d'inflammation, rejoignent la circulation sanguine pour exercer différents rôles systémiques. Elles exercent notamment des effets importants au foie en induisant l'expression des protéines de la phase aigüe [374], impliquées dans la progression de l'inflammation [375, 376], mais servent également de marqueurs sériques du degré d'inflammation (par exemple, CRP, section 1.5 et note de bas de page) [377]. L'IL-6 est produite par de nombreux types cellulaires par des mécanismes transcriptionnels impliquant NF- $\kappa$ B [336, 378]. Nous avons illustré à la figure 7 les voies de signalisation principales induites par cette cytokine, suivant l'engagement de son récepteur.



**Figure 7 : Voies de signalisation principales d'IL-6.**

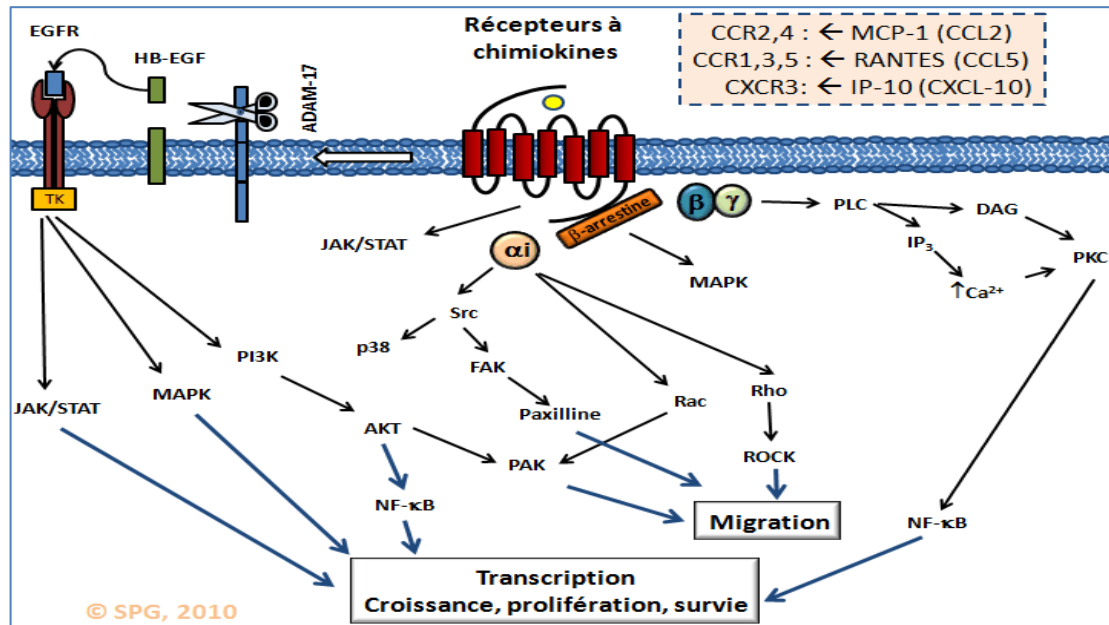
Le co-récepteur gp130 est exprimé de façon ubiquitaire [379]. Le récepteur d'IL-6 (IL-6R) doit interagir avec 2 modules gp130 pour pouvoir induire une signalisation. Les cellules qui n'expriment pas l'IL-6R peuvent tout de même être sensibles à l'IL-6 puisque l'IL-6R est clivé par ADAM-17 [380], ce qui libère une forme soluble active (sIL-6R) [381]. Suite à la liaison du ligand, les tyrosines kinases de la famille JAK se transphosphorylent et phosphorylent certaines tyrosines des co-récepteurs gp130 [382], ce qui permet l'induction de la voie MAPK via la protéine Ras [336], et le recrutement et la phosphorylation de STAT3. NF-IL6 (ou C/EBP- $\beta$ ), un facteur de transcription de la famille C/EBP [383], est un substrat des MAPKs. NF-IL6 peut agir en synergie avec plusieurs facteurs de transcription dont Elk1 [384] et NF- $\kappa$ B [385, 386]. NF-IL6 induit également ISGF3 $\gamma$  (p48) [387], que nous abordons au chapitre 3. STAT3 est un facteur de transcription aux multiples rôles dans le cancer et l'inflammation (voir [388]).

L'IL-6 induit plusieurs phénomènes inflammatoires abordés précédemment : activation des cellules endothéliales et recrutement des leucocytes [389], production de métalloprotéases [390], migration et prolifération cellulaire [341, 391, 392]. L'induction du facteur de transcription STAT3 par l'IL-6 (figure 7) explique en grande partie pourquoi cette cytokine est si étroitement liée aux processus inflammatoires [388, 393]. STAT3 induit entre autres l'expression d'IL-6 [388]. En collaborant avec NF- $\kappa$ B, STAT3 potentialise l'expression de gènes encodant pour des cytokines et des chimiokines [393] (voir également section 1.6).

### 1.4.2 Les chimiokines

Il existe chez l'humain plus de 30 chimiokines et 18 récepteurs à chimiokines [394]. Durant l'inflammation, comme nous l'avons mentionné auparavant, les chimiokines sont impliquées dans la migration et l'activation de leucocytes. Les chimiokines peuvent être sécrétées par de nombreux types cellulaires et exercent leurs effets sur une grande variété de cellules immunitaires (voir tableau 3). Les chimiokines forment 4 classes distinctes selon la position de cystéines présentes au sein d'un motif conservé, nommées : CXC (ex : l'IL-8, IP-10), CC (ex : RANTES, MCP-1), C (ex : lymphotactin) et CX3C (ex : fractalkine) [309]. Nous avons illustré différentes voies de signalisation induites par les chimiokines à la figure 8. Certaines cytokines, dont RANTES, peuvent exercer leurs effets par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs [309]. MCP-1 est associée à différentes pathologies inflammatoires telles que le cancer [347], l'athérosclérose [395] et l'arthrite [396]. MCP-1, qui est étroitement liée au processus d'angiogenèse [348], contribuerait à la malignité des tumeurs [397, 398] et à la rupture des plaques athéromateuses [399, 400]. RANTES [401, 402] et IP-10 [354] ont également un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. Par exemple, RANTES peut induire l'expression de métalloprotéases impliquées dans la progression du cancer [403, 404]. Un autre point remarquable est la capacité que possède MCP-1 de moduler la perméabilité des cellules endothéliales, ce qui a

un impact possible sur la barrière hémato-encéphalique [405] et le développement de l'athérosclérose [350].



**Figure 8 : Exemples de voies de signalisation induites par les chimiokines.**

Les chimiokines lient des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (GPCR). La majorité des ces récepteurs sont couplés à  $G\alpha_i$  [406].  $G\alpha_i$  induit l'activation de la protéine kinase Src [407] qui est impliquée dans la migration [408] et dans l'activation de FAK [409, 410] et de p38 [411]. Les sous-unités  $\beta\gamma$  induisent l'activation de différentes PLC [412], ce qui mène à l'augmentation cytosolique de la concentration en calcium et la production de DAG. Différentes kinases seront activées par cette augmentation de calcium, notamment les PKC [410]. Les protéines Rho [413] et Rac [414], sont activées par les chimiokines. Elles induisent également des voies de signalisation variées menant à l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la migration, la survie et la prolifération, notamment de NF- $\kappa$ B [411, 415-418]. Plusieurs récepteurs à chimiokines transactivent des récepteurs à activité tyrosine kinase [419-422]. Ces récepteurs mènent également à l'induction de voies transcriptionnelles et favorisent la migration cellulaire. Finalement, la  $\beta$ -arrestine, impliquée dans l'internalisation des récepteurs à chimiokines, fait partie d'un complexe multiprotéique qui a un rôle important dans le chimiotactisme [423]. Mentionnons que l'importance relative de chacune des voies dans l'induction de la migration est variable d'un type cellulaire à l'autre [424]. Pour des explications supplémentaires, nous référons le lecteur curieux à d'excellentes revues de littérature [347, 425, 426].

## 1.5 Inflammation chronique et para-inflammation

Il est maintenant reconnu que de nombreuses pathologies inflammatoires systémiques ont une influence sur le développement d'autres pathologies [8, 36]. À titre d'exemples, l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type II, maladies caractérisées par l'expression de nombreux médiateurs inflammatoires [427], ont été significativement liées à la dysfonction endothéliale [428] et au développement de l'athérosclérose et de ses complications [429]. L'hypertension, l'un des principaux facteurs de risque de l'athérosclérose, aurait également une origine inflammatoire [430]. Ces maladies ont été qualifiées d'inflammation *low-grade* ou para-inflammation<sup>12</sup> [8], puisqu'elles ne présentent pas les caractéristiques classiques de l'inflammation (vues précédemment) et se caractérisent par des taux sanguins faibles du marqueur de l'inflammation CRP (protéine C-réactive<sup>13</sup>) [7]. De manière frappante, la majorité des maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde [432], lupus systémique érythémateux [433], diabète de type 1 [434], psoriasis [435], sclérodermie systémique [436]) et les infections multiples [437] exacerbent le développement des maladies vasculaires.

Comment pourrions-nous expliquer ce lien si robuste entre les différentes maladies inflammatoires, qui semblent véritablement se nourrir l'une et l'autre ? À la section 1.3.4, nous avons défini l'inflammation chronique comme étant une condition où l'inflammation aiguë ne pouvait pas être résolue. Ainsi, tout nous porte à croire que les médiateurs pro-inflammatoires sanguins d'une maladie inflammatoire systémique peuvent moduler la progression et la résolution d'une inflammation locale (voir figure 9). Le test clinique de résolution de l'inflammation classique, celui du *wound healing* (guérison d'une blessure infligée), nous éclaire à ce sujet. Il semble que les patients atteints de diabète [438], de sepsis grave ou de choc septique [439] présentent un retard dans la résolution des plaies.

---

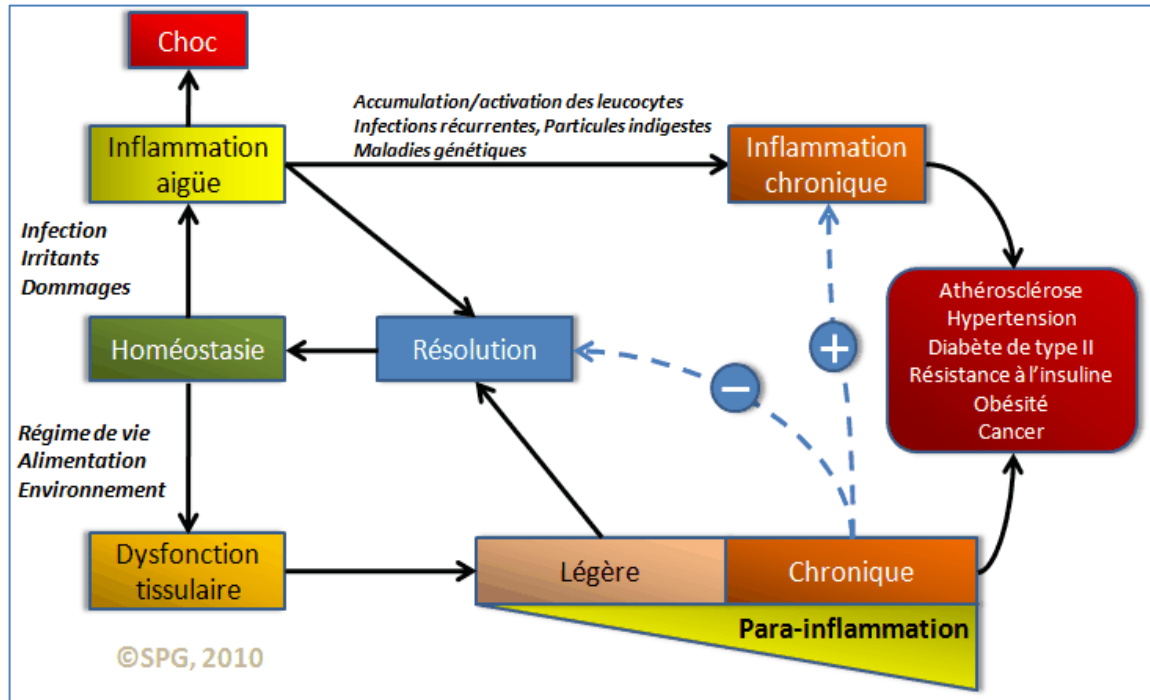
<sup>12</sup> Ce dernier terme a été introduit par Ruslan Medzhitov, ancien étudiant du célèbre Janeway, et qui étonne par ses nombreuses publications pionnières dans le domaine de l'immunité et de l'inflammation.

<sup>13</sup> IL-6 stimule la libération hépatique de CRP, une protéine de la phase aiguë. CRP est un marqueur de l'inflammation vasculaire, mais son rôle demeure mal défini et son implication dans l'athérosclérose est sujette à controverse [431].



Ces conclusions pourraient certes être transposées à celles des blessures internes et bien définies par le corps médical (définies dans [440]). Or, il appert que les maladies métaboliques telles que l'obésité sont associées à l'inflammation (on qualifie d'ailleurs ces états de « métaflammation » [36]) par l'expression accrue de nombreux médiateurs pro-inflammatoires mentionnés dans les sections précédentes (TNF, IL-6, MCP-1, etc.) [427]. Le TNF, par exemple, est exprimé par le tissu adipeux chez l'humain obèse [441] et dans des modèles animaux d'obésité [442]. Au chapitre 2 de cette introduction, nous discuterons de l'athérosclérose et, à la lumière de différentes recherches récentes, illustrerons les liens moléculaires qui unissent l'hypertension, mais également les infections, au développement de cette maladie chronique.

Différentes voies moléculaires peuvent d'ailleurs agir de manière synergique pour induire l'expression des gènes (combinaisons de cytokines [443], de cytokines et de PAMPs [444], de différents PAMPs [138], etc.). Ceci est entre autres explicable par la régulation complexe de certains promoteurs, des cas probants étant ceux de cytokines telles que RANTES [136], ou de manière encore plus frappante celui de l'IFN $\beta$  (chapitre 3, figure 32) [445].



**Figure 9 : Distinction entre les différentes formes d'inflammation et implications cliniques.**

La para-inflammation est un état inflammatoire de bas niveau qui peut atteindre la chronicité. La para-inflammation se caractérise d'abord par une dysfonction tissulaire. Le foie, le tissu adipeux et l'endothélium vasculaire peuvent tous présenter une certaine dysfonction, notamment en fonction des conditions environnementales et le régime de vie. Notre société se démarque par une consommation excessive de nourriture, l'exposition à la pollution et des produits toxiques (ex : la fumée du tabac), l'inactivité physique, ainsi qu'une prolongation de la vie à des limites supérieures à celles atteintes par nos ancêtres. Il semble que l'être humain ne soit pas adapté à ces différents changements [8, 36]. Le choc septique et les réponses allergiques sont d'autres exemples de situations auxquelles il n'est pas adapté [8]. Ainsi, la dysfonction tissulaire progressive atteindra des niveaux chroniques qui influenceront à l'échelle systémique différents procédés inflammatoires. Les médiateurs de l'inflammation (ex : le TNF), à cette échelle, sont en partie responsables de cette amplification de l'inflammation. Par exemple, l'utilisation d'infliximab, un anticorps dirigé contre le TNF, chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde améliore leur résistance à l'insuline [446] et diminue leurs risques de thrombose [447].

## 1.6 Inflammation, cancer et hypoxie

Il est maintenant bien reconnu que les processus inflammatoires sont à la base du développement du cancer [448]. Notamment, les infections augmentent les risques de cancer [449]. Les infections, telles que celles à *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ou aux virus des hépatites B/C (HBV/HCV) sont associées à différents types de cancer [450]. Parmi les nombreux leucocytes retrouvés dans les tumeurs (neutrophiles, mastocytes, cellules dendritiques, etc.), les macrophages y détiennent un rôle clé. Nous appelons ces macrophages TAMs (*tumor-associated macrophages*) [451]. Nous pouvons aisément transposer les points saillants de l'inflammation chronique au développement du cancer. En effet, les TAMs libèrent des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines, des ROS et des protéases qui favorisent de plusieurs manières le développement des tumeurs [448]. Les ROS, par exemple, peuvent induire des perturbations de l'ADN et ainsi favoriser l'établissement de mutations [452, 453]. Les cytokines telles que le TNF et l'IL-6 [454] peuvent induire l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et la survie des tumeurs. De multiples études démontrent que NF- $\kappa$ B [455, 456] et STAT3 [457, 458], dont les effets pro-inflammatoires ont été abordés, ont un rôle crucial dans le développement des cancers. De plus, il a été récemment découvert dans les cellules cancéreuses que STAT3 avait la capacité de se lier à RelA/p65 (une sous-unité de NF- $\kappa$ B dont nous discuterons au chapitre 3) et de le retenir au noyau, entraînant ainsi une activation constitutive de ce facteur de transcription [459]. Finalement, NF- $\kappa$ B ou STAT3 sont activés dans 50% des cancers [460]. Ces mécanismes sont des exemples parmi d'autres où la tumeur utilise les médiateurs de l'inflammation à son avantage.

Il est connu depuis longtemps que les tumeurs ont la capacité d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, ce qui leur permettra entre autres de créer des métastases [461]. Or, cette réponse angiogénique est induite en grande partie par la réponse hypoxique. Tel qu'observé dans les processus inflammatoires où les zones riches en macrophages sont associées à une déplétion de l'oxygène [462], les tumeurs solides sont également

placées dans un microenvironnement hypoxique [463, 464]. L'hypoxie<sup>14</sup> est depuis longtemps reconnue associée aux tumeurs puisqu'elle est la cause de l'insuccès de nombreuses thérapies [465-467]. En effet, cette hypoxie induit des voies de signalisation précises, autant dans les cellules cancéreuses [468, 469] que dans les TAMs [470], qui favoriseront entre autres l'angiogenèse et la résistance aux traitements. HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*), le facteur de transcription maître de la réponse hypoxique, protège par exemple contre l'apoptose induite par les radiations, ce qui confère un avantage prolifératif aux tumeurs [471, 472]. Dans la section qui suit, nous allons aborder les fondements de la réponse hypoxique, dirigée par HIF-1.

### 1.6.1 HIF-1

HIF-1 est un hétérodimère formé à partir de 2 des 4 membres la famille des facteurs de transcription PAS (basic-loop-helix/PER/ARNT/SIM), HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$ /ARNT [473]. HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  (EPAS1) et HIF-3 $\alpha$  (IPAS) sont inductibles, alors que HIF-1 $\beta$  est constitutivement exprimé. HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ , qui possèdent des domaines de transactivation, s'associent avec HIF-1 $\beta$  pour induire la transcription des gènes. HIF-3 $\alpha$ , quant à lui, serait un inhibiteur de la transcription [474]. HIF-1 $\alpha$  est exprimé de manière ubiquitaire, alors que l'expression de HIF-2 $\alpha$  est limitée à quelques tissus [475]. HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  sont inductibles par l'hypoxie, d'où leur nom. HIF-1 $\alpha$  est le membre le mieux caractérisé et nous ne discuterons que de lui<sup>15</sup>.

HIF-1 a la capacité de lier l'ADN au niveau d'éléments de réponse HRE (*hypoxia response element*) de séquence consensus 5'-(A/G)CGTG-3' [477, 478]. La voie

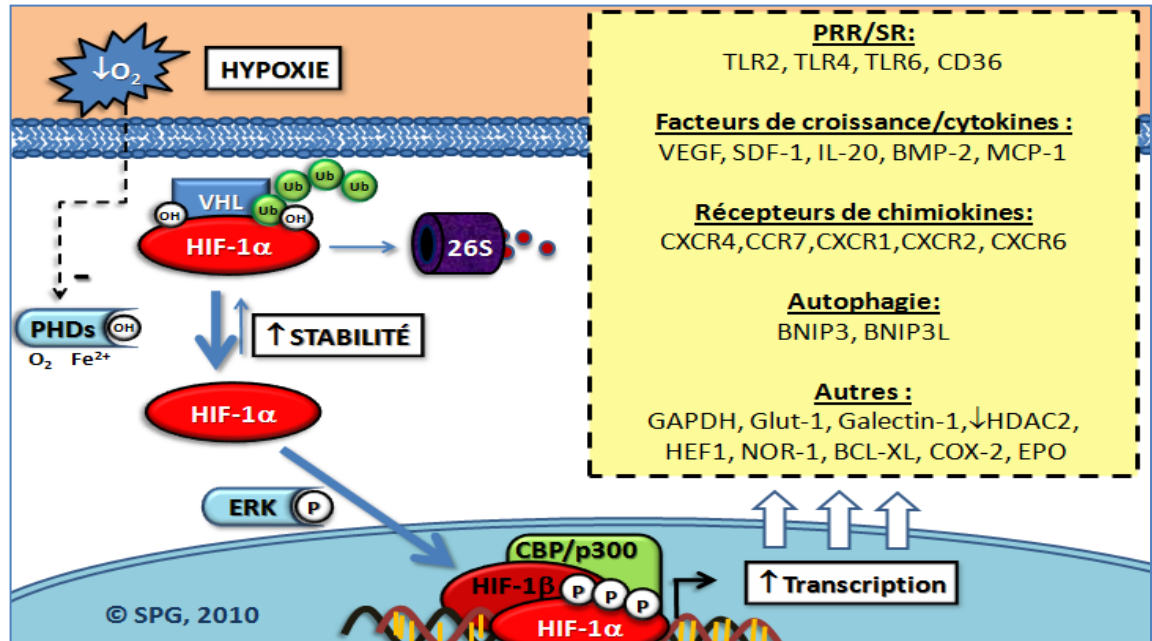
---

<sup>14</sup> L'hypoxie peut être classée de manière plus ou moins arbitraire de légère à sévère, selon le % en O<sub>2</sub> contrôlé en chambre hypoxique, ou selon la pression en oxygène tissulaire. Il faut la distinguer de l'anoxie, l'absence complète d'oxygène, et de l'ischémie, une privation de sang oxygéné (et donc également de nutriments). Une zone hypoxique n'est pas nécessairement ischémique, alors qu'une zone ischémique est forcément hypoxique voire anoxique (N.D.A.).

<sup>15</sup> Notons toutefois que HIF-2 $\alpha$  serait impliqué dans le développement du cancer [476].

d'activation classique de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie et l'induction de gènes comportant des éléments HRE dans leur promoteur et connus pour être induits par HIF-1 (en hypoxie) ont été illustrées à la figure 10. Il ne s'agit ici que d'une brève esquisse, puisque l'usage de MEFs *Hif1a*<sup>-/-</sup> a montré que HIF-1 régulait 234 gènes en hypoxie [479]. Nous remarquons que le programme transcriptionnel induit par HIF-1 assure la survie [480], la réparation (la résolution de l'inflammation), et stimule les cellules myéloïdes dans leur capacité à reconnaître les pathogènes et à les éliminer [291, 481].

En fait, HIF-1 a été montré essentiel à la fonction inflammatoire des cellules myéloïdes [482]. De plus, HIF-1 induit entre autres le VEGF [483] qui favorisera la prolifération des cellules endothéliales et la formation de néo-vaisseaux sanguins [484]. Ainsi, le rôle de HIF-1 est protecteur avant tout. Il a d'ailleurs récemment été reconnu comme cardioprotecteur [485], et la recherche médicale actuelle voit en HIF-1 un candidat potentiel dans le traitement de l'ischémie [486-488]. Cependant, en condition d'inflammation chronique, l'expression de HIF-1 peut avoir des effets délétères. Il a été montré que l'expression de HIF-1 $\alpha$  est induite dans le tissu hypoxique, par exemple dans l'arthrite [489, 490] et l'athérosclérose [491, 492], et associée à la présence de macrophages actifs. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les neutrophiles et les macrophages peuvent être à l'origine de l'inflammation chronique. La délétion conditionnelle de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules myéloïdes, à l'aide du système cre-lox dans un modèle murin d'inflammation aigüe, montre que HIF-1 $\alpha$  est responsable de la réponse inflammatoire et de la destruction de tissus [482]. Par ailleurs, l'expression de HIF-1 $\alpha$  est induite dans plusieurs types de tumeurs [493] par différents procédés [494-497], et est également liée à leur progression [493, 498]. Or, la cellule est naturellement pourvue de mécanismes pour atténuer ces effets de HIF-1. En effet, l'induction de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie est transitoire, et des procédés de régulation négative sont induits pour bloquer son activité à long terme [499-501].

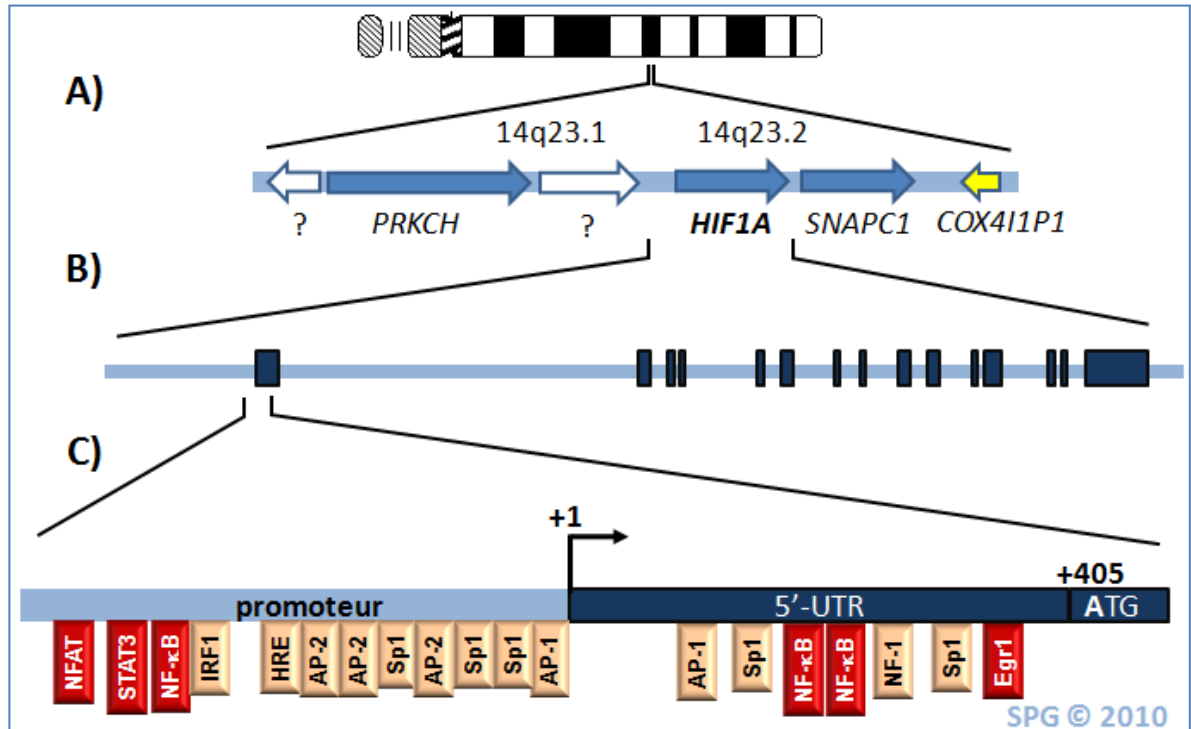


**Figure 10 : Aperçu de la régulation et du rôle de HIF-1alpha en hypoxie.**

HIF-1 $\alpha$  est, **en condition normale (normoxique)**, difficilement détectable puisqu'il est dégradé par le protéasome 26S. HIF-1 $\alpha$  est hydroxylé aux prolines 402 et 564 par les prolyl-hydroxylases (PHDs) [502-504]. Ces modifications post-traductionnelles permettent la liaison de Von Hippel Lindau (VHL) à HIF-1 $\alpha$  au niveau de son domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD). Une fois recruté, VHL induit l'ubiquitination de HIF-1 $\alpha$ , ce qui entraîne sa dégradation [505]. Les PHDs sont des enzymes dont l'activité dépend de la présence d'oxygène et de fer. Une déplétion de l'un ou l'autre de ces éléments inhibe ces enzymes. **En situation hypoxique**, les PHDs sont donc inhibées, et HIF-1 $\alpha$  est induit suivant une augmentation de sa stabilité. HIF-1 $\alpha$  est relocalisé au noyau, forme un hétérodimère avec HIF-1 $\beta$ /ARNT [506], s'associe avec des co-activateurs tels que CBP et p300 [507] pour transactiver de nombreux gènes. HIF-1 induit avant tout des gènes de survie : *EPO* (érythropoïétine) pour favoriser le développement des érythrocytes [477], *GAPDH* [508] et *GLUT1* [509] pour augmenter le flux glycolytique, *BCL2L1* [510] et les gènes de l'autophagie [480] pour favoriser la survie. Il régule d'emblée le facteur de croissance *VEGFA* [483], inducteur pivot de l'angiogenèse. Des recherches récentes montrent que HIF-1 peut également induire l'expression des TLRs [511], de CD36 [512], de nombreux récepteurs de chimiokines dont CXCR4 [513] et des ACEs [514] (section 2.4.1.1). Ainsi, le programme génétique induit par HIF-1 le place comme un facteur clé de l'immunité innée, de l'inflammation et du cancer. Des kinases telles que ERK1,2 sont impliquées dans la régulation de l'activité de HIF-1 par phosphorylation [515]. Par ailleurs, les kinases telles ATM et GSK3 modulent positivement et négativement la stabilité de HIF-1 $\alpha$ , respectivement [516, 517]. Autres références : [518-529]. Ub : ubiquitine; OH : hydroxylation ; P : phosphorylation.

### 1.6.2 Régulation complexe de HIF-1 $\alpha$

Le premier mécanisme de stabilisation de HIF-1 $\alpha$  découvert est celui de l'inhibition de sa dégradation par l'ubiquitine ligase VHL [530] (voir figure 10). Ceci représente un mécanisme efficace et rapide d'induction de HIF-1 $\alpha$ , qui outrepassa l'induction transcriptionnelle plus lente. Depuis ce temps, des mécanismes transcriptionnels impliquant notamment les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et STAT-3 (figure 11 et tableau 4), et des mécanismes traductionnels impliquant les extrémités 5' et 3'-UTR de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$  (figure 13) ont été montrés impliqués dans la régulation de HIF-1 $\alpha$ , ce qui complexifie grandement la compréhension de la régulation de ce facteur de transcription. De plus, il a été montré que l'induction de HIF-1 $\alpha$  n'était pas exclusive à la réponse hypoxique. De nombreux facteurs non-hypoxiques mentionnés dans ce chapitre peuvent en effet induire l'expression de HIF-1 $\alpha$ . Il semble que l'initiation même des processus inflammatoires par la reconnaissance de PAMPs viraux et bactériens ait la capacité d'induire HIF-1 $\alpha$  [291]. La triade inflammatoire TNF, IL-6 et IL-1 induit également HIF-1 $\alpha$ . Finalement, différents facteurs de l'homéostasie du système cardio-vasculaire modulent l'expression de HIF-1 $\alpha$ . La thrombine, l'insuline, les facteurs de croissance et l'angiotensine II en sont des exemples connus. Nous répertorions les inducteurs susmentionnés en fin de chapitre au tableau 5, après avoir traité des différents modes de régulation de HIF-1 $\alpha$ . Ainsi, l'induction non-hypoxique de HIF-1 $\alpha$  par ces différents facteurs établit peut-être un lien entre la para-inflammation et l'établissement de maladies inflammatoires chroniques.



**Figure 11 : Contexte génomique de HIF1A et régulation transcriptionnelle.**

**A)** Le gène *HIF1A* humain est présent en une seule copie au niveau du chromosome 14 et situé au locus 14q23.2. Il est voisin de *PRKCH* (protein kinase C $\eta$ ), de *SNAPC1* (*small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1*) et d'un pseudogène de *COX4I1* (*cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1*). On y retrouve également des locus potentiels (symbole ?). **B)** L'organisation du gène *HIF1A* est répartie en 15 exons [531], ce qui est conservé chez la souris [532]. Les exons 1 et 15 comprennent des séquences non-codantes (UTR, *untranslated terminal regions*) (voir figure 13). **C)** Le promoteur de *HIF1A* est TATA-indépendant et contient plusieurs éléments Sp1 [531]. On retrouve de nombreux sites de liaison de facteurs de transcription inductibles dans le promoteur proximal en amont du site d'initiation de la transcription (+1), mais également au niveau de la séquence 5'-UTR. Plusieurs éléments de réponse (en rouge) ont été caractérisés et validés par différents essais (tableau 4), alors que d'autres ont été identifiés grâce à des logiciels d'algorithmes (Genomatix [533], TESS (usage personnel)). À cet effet, l'usage du logiciel TESS montre la présence d'éléments de réponse potentiels et intéressants, tels que celui de la myogénine et de WT1 (*Wilms tumor 1*), tous deux liés au cancer [534, 535] (N.D.A.). Les représentations schématiques de cette image ne sont pas à l'échelle.



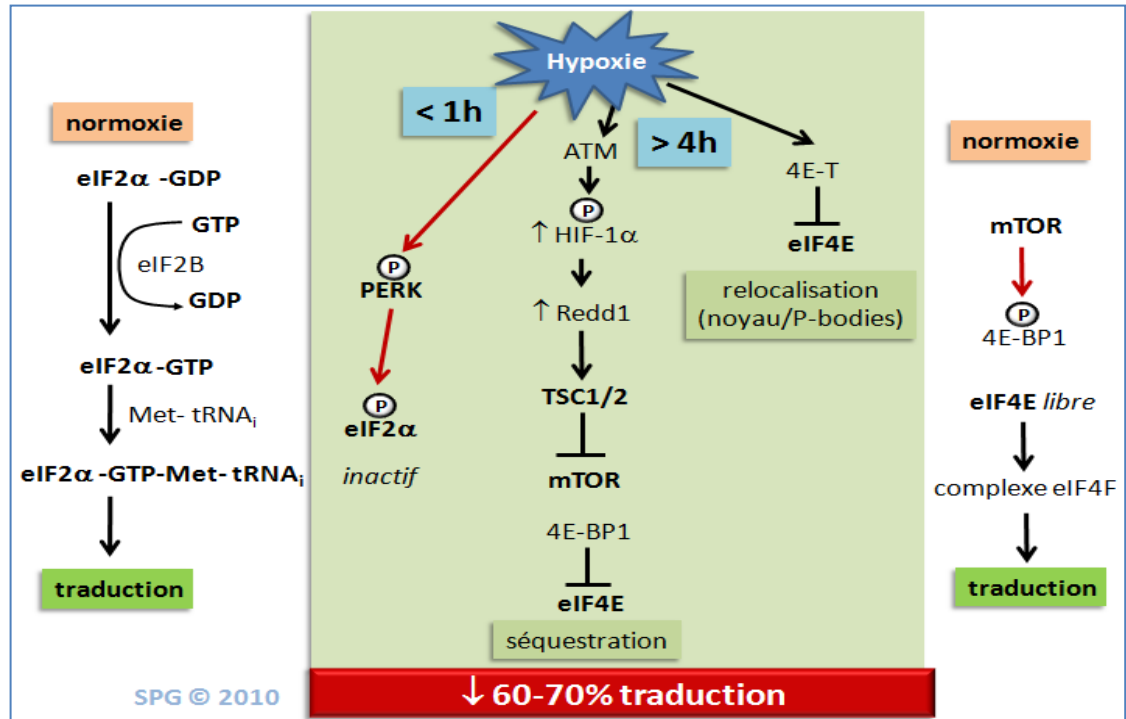
Facteur de transcription	Essai rapporteur*	ChIP	Notes
<b>NF-κB</b>	[536-538]	[536-540]	RelA, RelB, c-Rel, p50 et p52 peuvent lier le promoteur de manière basale. La liaison de RelA est induite par l'hypoxie, le LPS, le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , la thrombine, et est augmentée dans des tumeurs.
<b>STAT3</b>	[541]	[541]	Liaison du promoteur dans des lignées transformées et des tumeurs.
<b>Egr1</b>	Voir notes	[542, 543]	Induction de la liaison par l'hypoxie et le PIGF. L'induction du promoteur en essai luciférase (hypoxie) est bloquée par un oligonucléotide antisens dirigé contre Egr1.
<b>NFAT</b>	[544]	[544]	Induction par l'ionomycine dans les mastocytes.
<b>Sp1</b>			[533]
<b>NF-1</b>			[533]
<b>AP-1, AP-2</b>			[533]
<b>IRF-1 ?</b>			Découvert sur TESS
<b>ISGF3 ?</b>			Éléments ISRE potentiels dans certains introns [545]

**Tableau 4 : Facteurs de transcription qui modulent le gène *HIF1A*.**

Nous avons sélectionné les principaux facteurs de transcription qui régulent l'expression de HIF-1α en se basant sur de solides évidences expérimentales. En rouge : les principaux facteurs de transcription inductibles (voir figure 11), en beige : éléments constitutifs ou potentiellement induits. \* Les expériences d'essai rapporteur sélectionnées utilisent une version mutée de l'élément de réponse correspondant au sein du promoteur. Abréviations : ChIP : immunoprécipitation de la chromatine; Egr1 : *Early growth response 1*; PIGF : *Placenta growth factor*. ; TESS : *Transcription Element Search System* (URL: <http://www.cbil.upenn.edu/tess>).

### 1.6.3 Le paradoxe traductionnel en hypoxie

L'un des aspects les plus intrigants de l'induction spécifique de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie est que la réponse hypoxique a pour effet d'inhiber de manière importante la synthèse protéique cellulaire. Cette baisse de 60-70% du régime traductionnel est l'un des mécanismes par lesquels la cellule hypoxique se protège. En effet, la traduction est un processus grandement endergonique (25-30% de l'oxygène utilisé pour produire de l'ATP sert à la traduction [546]), et une économie de traduction a été montrée avantageuse, notamment pour les cellules cancéreuses. La traduction est principalement régulée au niveau de l'initiation [547], qui est d'ailleurs l'étape modulée en hypoxie [548]. Deux processus de modulation de la traduction en hypoxie sont la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  [548-550] et l'inhibition de la phosphorylation de 4E-BP1 [551, 552]. Ces processus affectent la traduction cap-dépendante des messagers. La kinase sensible à la rapamycine mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) détient un rôle clé dans le contrôle de la traduction. mTOR phosphoryle des cibles impliquées dans la traduction telles que 4E-BP1 et p70-S6K. Or, tel qu'illustré à la figure 12, l'état d'activation de mTOR change drastiquement lors de l'hypoxie. mTOR est maintenu actif par une petite protéine G de la famille Ras nommée Rheb, lorsque celle-ci est liée au GTP [553]. L'activation de mTOR est inhibée par le complexe TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*), composé de TSC1 (*hamartin*) et de TSC2 (*tuberin*). TSC2 est un facteur d'activation des GTPases. Lorsque TSC2 est actif, il bloque la traduction en privant mTOR de Rheb-GTP, maintenant liée au GDP [554, 555]. Il a été montré que le complexe TSC est contrôlé par phosphorylation, un processus intimement relié à l'état de stress cellulaire, que ce soit durant l'hypoxie, la privation d'éléments nutritifs ou la réponse immunitaire. Les facteurs de croissance, par exemple, mènent à la phosphorylation inhibitrice de TSC2 par des voies dépendantes de Pi3K/Akt ou des MAPK (les phosphorylations de TSC1 et de TSC2 sont revues dans [556]). Il a également été montré que TSC2 était inhibé par les protéines 14-3-3, et que l'hypoxie mène au déplacement de ces protéines et à l'activation du complexe TSC. De plus, la phosphorylation de TSC2 augmente son interaction avec les protéines 14-3-3 [557].

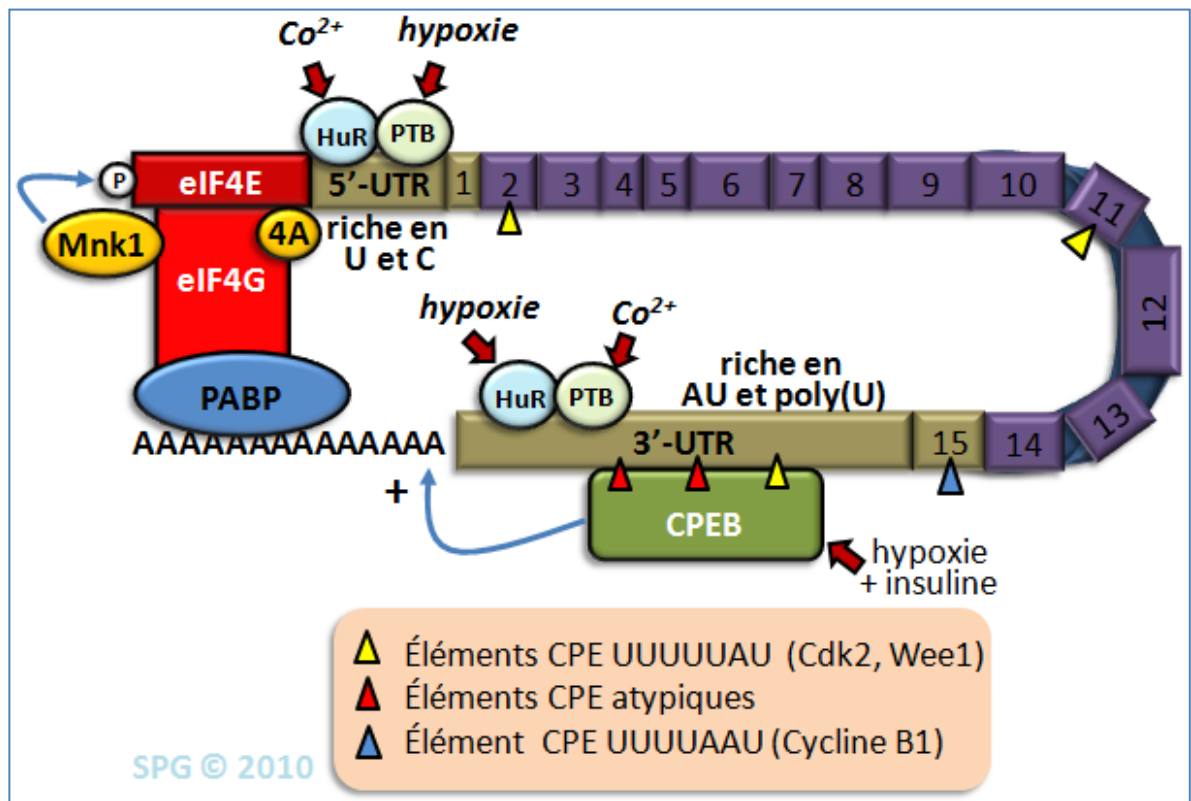


**Figure 12 : Modulation de l'initiation de la traduction en condition hypoxique.**

**En normoxie**, en incluant la présence d'éléments nutritifs comme les acides aminés essentiels et le glucose, l'initiation de la traduction est favorisée pour l'ensemble des messagers. Nous illustrons ici les procédés de régulation cap-dépendants impliquant eIF2α et 4E-BP1. eIF2α lié au GTP et à l'ARNt initiateur forme le complexe ternaire, essentiel au recrutement de la sous-unité 40S ribosomiale à l'ARNm à traduire [547]. Par ailleurs, la protéine qui lie le cap (7-méthyl-guanine) en 5' des ARNm est eIF4E. eIF4E forme avec eIF4G, une protéine adaptatrice complexe, et eIF4A, une hélicase, le complexe eIF4F au rôle essentiel dans l'initiation [547]. Ceci est rendu possible grâce à la phosphorylation de la protéine de liaison à eIF4E, 4E-BP1 (4E *binding protein*) par mTOR [558]. mTOR est un régulateur positif de la traduction qui est hautement sensible à différents stress (hypoxie, carences alimentaires, infections, etc., revu dans [559, 560]). mTOR est régulé négativement par le complexe TSC1/TSC2. En normoxie, ce complexe est inhibé, notamment par la liaison des protéines 14-3-3 [561]. **En hypoxie**, on assiste à une activation rapide de la kinase PERK (et d'autres voies de la réponse UPR) [562], ce qui mène à la phosphorylation de eIF2α. Cette modification empêche eIF2B d'agir en tant que facteur d'échange et eIF2α ne peut lier le GTP. L'hypoxie entraîne également l'inhibition de mTOR, ce qui serait une réponse tardive impliquant l'activation de HIF-1α. Il a été montré que HIF-1α induit l'expression de Redd1 qui active le complexe TSC1/TSC2 en déplaçant 14-3-3 [563]. eIF4E est donc séquestré en hypoxie par 4E-BP1, ainsi que par 4E-T, une autre molécule moins caractérisée [548].

Ainsi, comment réconcilier cette inhibition généralisée de la traduction avec l'induction spécifique de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie ? Au cours des dernières années, quelques études se sont intéressées à la régulation de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$ , que ce soit au niveau de sa stabilité ou au niveau de sa traduction. HIF-1 $\alpha$  ne fait pas cavalier seul : d'autres gènes, incluant des gènes régulés par HIF-1 lui-même, tels que ceux du *VEGF* [564, 565] et de *GLUT1* [566], sont également assujettis à une régulation de leur messenger en condition hypoxique. Des procédés « cap-indépendants » régulent donc ces messagers, et ce, principalement grâce à des protéines de liaisons aux ARNs (RBPs, *RNA-binding proteins*) qui ont la capacité de reconnaître certaines séquences au sein des extrémités 5' et/ou 3'-UTR des messagers et d'interagir avec des éléments de l'appareil traductionnel, sans nécessité d'un cap « activé » [567]. Nous présentons à la figure 13 les principales RBPs connues pour moduler la stabilité et/ou la traduction du messenger de HIF-1 $\alpha$ . L'hypoxie et son agent mimétique, le cobalt, induisent la liaison des protéines HuR et PTB au niveau des extrémités 5' et/ou 3'-UTR du messenger *HIF1A* [568]. Le mécanisme par lequel ces protéines affectent précisément la traduction de HIF-1 $\alpha$  n'est pas connu. Il a également été montré que l'insuline favorisait la liaison des protéines CPEB 1 et 2 sur le messenger de HIF-1 $\alpha$  en 3'-UTR, et que ceci augmentait sa traduction [569].

Un autre mode de régulation « cap-indépendant » retrouvé chez certains ARNm viraux ou cellulaires s'explique par la présence d'un IRES (*Internal ribosome entry site*) dans la séquence 5'-UTR. Cette structure est issue du repliement tridimensionnel spécifique de l'ARNm en une structure complexe qui possède habituellement plusieurs boucles double brins. Les IRES sont prédictibles au sein d'une séquence, cependant la validation de la fonctionnalité des IRES doit être effectuée pour considérer leur rôle dans la traduction des messagers. Bien que le mécanisme d'action des IRES ne soit pas entièrement caractérisé, on considère que ces structures ont la capacité de mener au recrutement des facteurs généraux de la traduction, phénomène qui ne nécessite donc pas la présence d'un cap fonctionnel.



**Figure 13 : Régulation du messenger de HIF-1α par les RBPs.**

Plusieurs RBPs sont suspectées d'être capables d'augmenter la stabilité et/ou la traduction du messenger *HIF1A* [567]. Nous avons ici schématisé le messenger de HIF-1α avec ses 15 exons. Les extrémités régulatrices 5' et 3'-UTR font partie des exons 1 et 15 respectivement. Les 2 séquences UTR sont très différentes. Visiblement, la large 3'-UTR est extrêmement riche en poly(U), alors que la 5'-UTR de taille moyenne est davantage riche en résidus C et U. Néanmoins, les 2 extrémités peuvent lier des RBPs, notamment HuR et PTB [567]. Il n'existe pas de consensus à l'heure actuelle quant à la liaison de l'une ou l'autre de ces extrémités en hypoxie ou à l'aide d'agents mimétiques de l'hypoxie. La séquence 3'-UTR présente quelques éléments CPE (*cytoplasmic polyadenylation elements*), reconnus pour pouvoir lier CPEB sur le messenger de HIF-1α [569]. Nous retrouvons d'autres éléments CPE aux exons 2, 11 et 15 (recherche personnelle). Il existerait en effet des domaines de liaisons de RBPs retrouvés ailleurs que dans les extrémités UTR chez certains messagers [570]. Il a été montré que CPEB pouvait être responsable de la polyadénylation [571], ce qui permet la liaison éventuelle de protéines telles que les PABP qui exercent une influence sur le complexe d'initiation de la traduction [572], tel que suggéré par l'illustration.

Inducteurs	Stabilité	Traduction	Transcription
Basal			IKK/NF- $\kappa$ B [538-540]
Hypoxie	PHD/VHL [505] I $\kappa$ B $\alpha$ /FIH [573] SUMOylation [574]	Indépendant des IRES [575]	Indépendant [576] PI3K/AKT et IKK/NF- $\kappa$ B [538]
Cobalt (agent mimétique de l'hypoxie)	PHD/VHL [505]	ROS [577] PTB/3'UTR;HuR/5'UTR [576] ROS/PI3K [578]	Indépendant [576, 578]
LPS/TLR4		ROS [579] ROS, ASK1, p38 [580]	[581] Indépendant de NF- $\kappa$ B [579]
Virus	OAA/Pyruvate [582] KSHV/vIRF3 [583] EBV/LMP1/Siah1 [584] HBx [585]		
Poly(dA :dT) Poly(IC)			Indépendant [586]
Ligand de TLR7/8			ROS/RNI [587]
OxLDL		ROS [588]	
IL-6			STAT3 [589]
TNF, IL-1		[590] Mécanisme inconnu [591]	NF- $\kappa$ B [539]
Angiotensine II Thrombine, Insuline heregulin	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [592]	5'UTR/ROS [593, 594] PI3K/mTOR [595] IGF-1R [596] CPEB1/2 [569]	PI3K/Akt, PKC [593] STAT3 [589]

**Tableau 5 : Exemples d'inducteurs de HIF-1 $\alpha$  et mécanismes d'induction.**

Le promoteur de *HIF1A* est occupé au niveau basal par différentes sous-unités de NF- $\kappa$ B [539]. Cependant, des processus transcriptionnels et/ou traductionnels qui modulent la l'expression de HIF-1 $\alpha$  doivent être induits pour que HIF-1 $\alpha$  ait la capacité d'induire la transcription de gènes. Les procédés par lesquels HIF-1 $\alpha$  est induit sont le plus souvent sujets à controverse. En hypoxie, par exemple, certains groupes voient une induction de l'ARNm de HIF-1 $\alpha$ , alors que d'autres n'y parviennent pas. Certains groupent croient plutôt que l'hypoxie induit une induction traductionnelle de HIF-1 $\alpha$ . En effet, l'ARNm de HIF-1 $\alpha$  contient des séquences 5'-UTR et 3'-UTR qui sont impliquées dans la stabilisation et/ou l'efficacité de la traduction de HIF-1 $\alpha$  [569, 576, 597]. L'extrémité 5'-UTR de HIF-1 $\alpha$  contient également un IRES virtuel qui n'exercerait pas un effet significatif dans la traduction de HIF-1 $\alpha$  [575, 598]. Nous ne présentons dans ce tableau que des inducteurs de HIF-1 $\alpha$  dont le mécanisme d'induction de HIF-1 $\alpha$  est connu (ou partiellement connu). Les virus élaborent des stratégies pour induire HIF-1 $\alpha$ , dont l'expression serait favorable à leur développement. Plusieurs PAMPs, cytokines, hormones et facteurs de croissance peuvent induire l'expression de HIF-1 $\alpha$ , et ce, dans différents types cellulaires. HIF-1 $\alpha$  peut donc être induit à tout moment lors des processus inflammatoires.

En ce qui concerne HIF-1 $\alpha$ , bien que deux équipes aient identifié un IRES potentiel en 5'-UTR [599] (ayant la capacité de lier PTB [600]), il a été montré plus tard que cet élément n'avait pas un rôle majeur dans la traduction de HIF-1 $\alpha$  [598]. À cet effet, la validation des IRES à l'aide d'essais rapporteurs à vecteurs bi-cistroniques a été questionnée de manière générale [601]. Une autre équipe a également invalidé cette hypothèse de régulation de HIF-1 $\alpha$  [575].

## **2. Bases inflammatoires de l'athérosclérose**

Au chapitre 1, nous avons exploré les bases des processus inflammatoires en illustrant la reconnaissance de signaux de danger, le rôle et la régulation de certaines cytokines, puis avons placé ces processus dans un contexte de chronicité, où des réponses aberrantes peuvent contribuer à l'aggravation de pathologies (par exemple la réponse hypoxique et l'angiogenèse). Nous allons maintenant appliquer ces notions à la maladie vasculaire de l'athérosclérose, une maladie inflammatoire, puis allons discuter de certaines bases moléculaires pro-inflammatoires qui contribuent au développement de cette maladie complexe.

### **2.1 Incidence et complications de l'athérosclérose**

Dans son rapport annuel de 2009 [602], le comité de statistiques de l'American Heart Association (AHA) a estimé que les maladies cardiovasculaires étaient responsables de 34,2% de toutes les morts aux États-Unis, soit 1 mort pour 2,9 morts. 1 américain sur 3 est atteint d'une ou plusieurs maladies cardiovasculaires : environ 30% des américains sont atteints d'hypertension, 7% ont des maladies de l'artère coronaire (incluant 3,3% qui ont eu un infarctus du myocarde), 2,4% sont atteints d'insuffisance cardiaque et 2,7% ont eu un accident vasculaire cérébral. Les coûts totaux associés aux maladies cardiovasculaires pour 2009 étaient estimés à 475,3 milliards de dollars US. Ainsi, la prévention est un atout majeur pour diminuer la mortalité et les coûts associés à ces maladies. En effet, le régime de vie des sociétés industrialisées est grandement responsable de la progression de ces maladies. La sédentarité [603], le tabagisme [604], les habitudes alimentaires (riches en lipides [605] et en sel [606]), sont des exemples qui peuvent mener à des maladies systémiques telles que l'obésité, le diabète de type II et l'hypertension, toutes considérées comme des facteurs de risque important des maladies cardiovasculaires [607-611] (voir section 1.5). Il est maintenant reconnu que le lien le plus évident entre ces maladies



inflammatoires systémiques et la morbidité cardiovasculaire est le développement de l'athérosclérose.

L'athérosclérose<sup>16</sup> est une maladie inflammatoire des vaisseaux sanguins caractérisée par l'accumulation de lipides et de macrophages, et par une perturbation structurale importante des vaisseaux sanguins. Nous présentons à la figure 14 la structure normale d'un vaisseau sanguin et les modifications qu'il a subit lorsqu'atteint d'athérosclérose. Tel qu'illustré, l'un des points saillants de la plaque athéromateuse est la présence d'un cœur lipidique souvent visible à l'œil nu, et fréquemment associé à une importante couche de tissu fibreux du côté luminal : le « cap fibreux ». Ce dernier est sensible à l'action de protéases induites par de multiples types cellulaires, ce qui mènera à sa rupture et la libération luminale de composés hautement thrombotiques et présents au sein de la plaque<sup>17</sup>. Les plaques qui ont ainsi cédé vont permettre la formation rapide d'un caillot sanguin (ou thrombus). La libération locale et l'embolie de ce thrombus à différents sites entraînera l'occlusion physique d'artères, et pourra mener à une ischémie et aux manifestations cliniques de l'athérosclérose [614, 615].

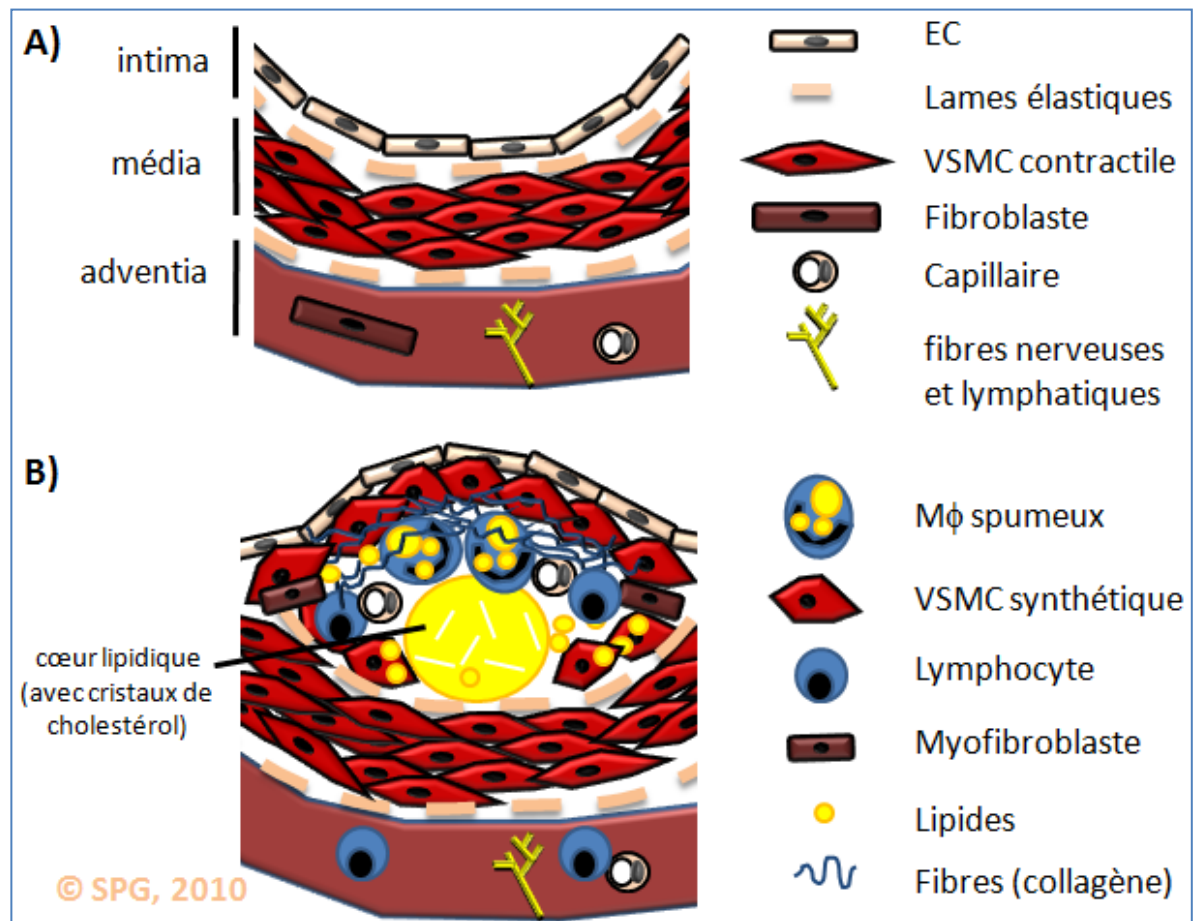
L'athérosclérose se développe progressivement chez l'humain tout au long de sa vie. Huit stades de développement lui sont associés, tel qu'établit par l'AHA [616-619]<sup>18</sup> et d'autres groupes [620]. Nous abordons ces différents stades à la figure 15. Nous discutons dans les prochaines sections de l'origine hémodynamique et inflammatoire de l'athérosclérose, avant de nous intéresser plus particulièrement à la cellule musculaire lisse vasculaire (VSMC), l'un de nos principaux modèles d'étude, qui a un rôle crucial dans le développement des lésions.

---

<sup>16</sup> Athérosclérose vient du grec «*athero*» qui signifie gruau/bouillie et «*scleros*» qui signifie durcissement. L'athérosclérose se manifeste en effet sous la forme d'une accumulation de lipides dans une artère rigide. On explique plus fréquemment ce terme par « durcissement des artères ».

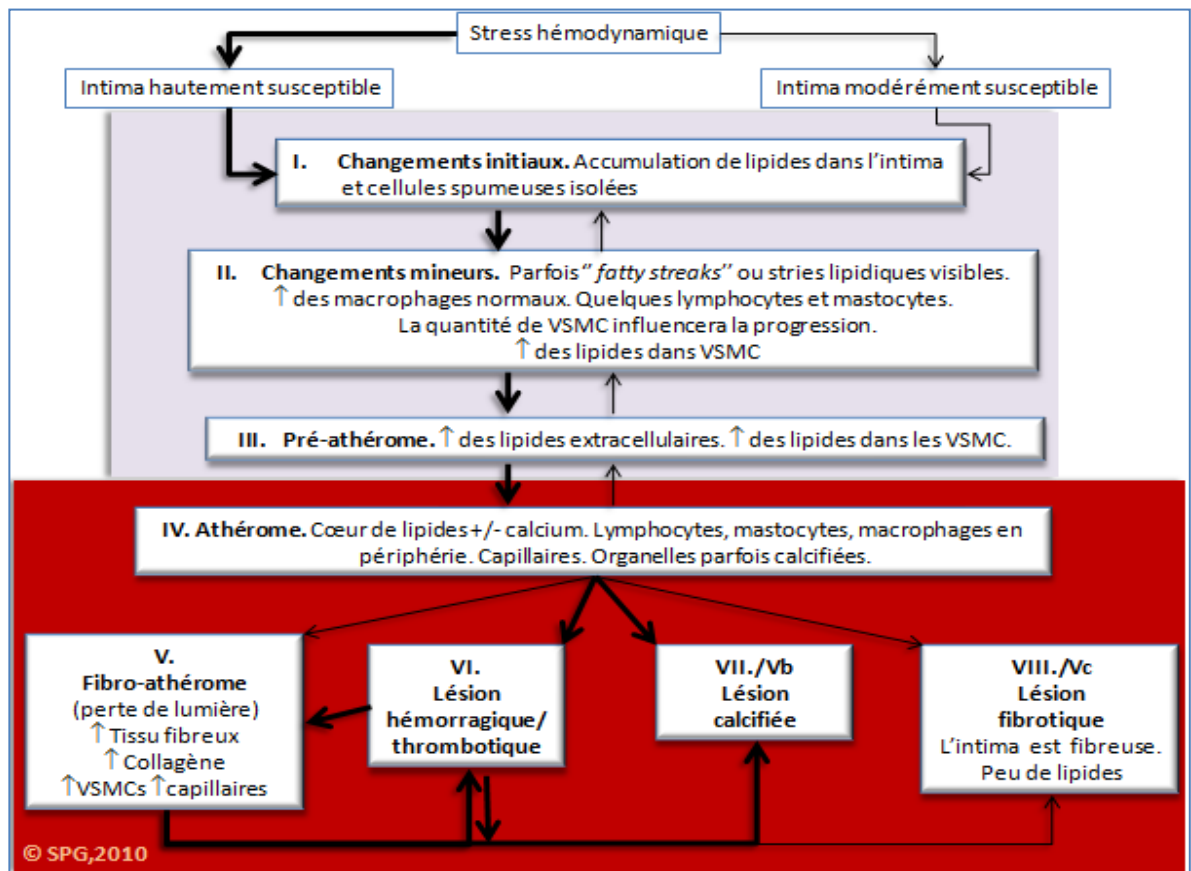
<sup>17</sup> Le facteur tissulaire (thromboplastine, facteur de coagulation III) est présent dans toutes les plaques athéromateuses, notamment dans le cœur lipidique, et est libéré par les macrophages et d'autres types cellulaires [612]. Il est en grande partie responsable de la formation de thrombi [613].

<sup>18</sup> Le comité des lésions vasculaires de l'AHA a publié 3 rapports simultanément dans *Circulation* et *ATVB* en 1992, 1994 et 1995. Nous invitons le lecteur à consulter ces rapports qui présentent une étude histologique détaillée de la constitution des lésions.



**Figure 14 : Schéma représentant les modifications morphologiques d'artères atteintes d'athérosclérose.**

**A)** Composition d'une artère normale. Dans l'intima, ou tunique interne, les EC font face à la lumière du vaisseau et reposent parfois sur une couche de tissu conjonctif lâche. Les VSMC contractiles forment un réseau serré et entouré de lames élastiques fenestrées pour composer la média, ou tunique moyenne. L'adventia est la tunique externe, et est composée de fibres de collagène, de petits vaisseaux sanguins (*vasa vasorum*), de fibroblastes, de fibres nerveuses et de vaisseaux lymphatiques [621]. **B)** Composition d'un fibro-athérome (stade V de l'AHA) [617]. Le vaisseau sanguin devient consistant et diminue fréquemment la lumière. On peut parfois observer à l'œil nu un cœur lipidique. En bordure du cœur lipidique, nous pouvons discerner des néo-vaisseaux et des cellules spumeuses (Mφ et VSMC). D'autres types cellulaires peuvent composer la lésion : lymphocytes T, mastocytes [622] et cellules dendritiques [623] (voir section 2.2.3.3). Les VSMC ont migré et forment la néo-intima. Elles ont changé de phénotype et sont en grande partie responsable de l'accumulation de fibres de collagène du côté luminal de la lésion (cap fibreux). L'adventia se voit également enrichie de lymphocytes T et B [624-626]. N'ont pas été illustrés : sites de microhémorragies et dépôts de fibrine présents dans la plaque.



**Figure 15 : Stades du développement de l'athérosclérose selon l'AHA.**

Les stades 1 à 3 sont asymptomatiques, mais lorsque diagnostiqués pourront aider à la prévention des complications de l'athérosclérose. Il n'est pas rare de discerner des stades 1 à 3 chez les jeunes [627]. Plusieurs stades sont réversibles [619], notamment grâce au changement du mode de vie [628] ou aux traitements pharmacologiques [629]. Le stade 4, l'athérome, est un stade avancé qui pourra se complexifier en 4 stades différents. Le stade 6 peut être le lieu d'épisodes successifs de thromboses. Le stade 5 diminue habituellement la lumière du vaisseau. Il existe quatre types de calcifications vasculaires : l'athérosclérose calcifiée, la calcification de l'artère médiale (sclérose de Mönckeberg), la calcification de la valve cardiaque et la calciphylaxis [630]. Concernant la lésion calcifiée, son développement serait étroitement lié aux BMPs<sup>19</sup> [632] et à l'angiogenèse progressive des plaques [633]. L'implication de la calcification dans la rupture des plaques reste mal définie. Il existe des critères pour évaluer les plaques vulnérables (section 2.2.3.1), cependant l'identification de patients vulnérables à risque par des méthodes non-invasives reste avantageuse [634].

<sup>19</sup> Les BMPs sont des cytokines de la famille du TGF- $\beta$  qui modulent la prolifération cellulaire, la migration, la sécrétion de cytokines et l'expression de molécules d'adhésion chez de nombreux types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose [631].

## 2.2 Une maladie inflammatoire

Dans cette section divisée en trois parties, nous allons illustrer à l'aide d'exemples l'implication de l'inflammation dans tous les stades de l'athérosclérose, de son initiation à l'étape ultime de sa rupture. Nous avons introduit au chapitre 1 les différentes composantes de la réponse inflammatoire. Nous invitons le lecteur à consulter les tableaux 1 et 3 de ce chapitre, qui présentent les PRRs et les cytokines associées aux maladies inflammatoires, dont l'athérosclérose. Nous ne passerons pas en revue dans cette section toutes les molécules impliquées et retrouvées dans l'athérosclérose. Nous référons le lecteur à d'excellentes revues de littérature sur les cytokines et d'autres médiateurs de cette pathologie [326, 635]

### 2.2.1 La localisation des lésions informe sur leur genèse

La distribution des plaques athéromateuses chez l'humain nous informe sur la contribution d'un facteur hémodynamique à leur développement [636, 637]. En effet, il appert que certaines régions de l'aorte et de ses branches principales sont placées en situation de turbulence, ou de perturbation du flux sanguin, particulièrement au niveau des coudes et des ramifications. Nous utiliserons le terme « perturbation de flux » pour décrire ce stress hémodynamique caractérisé<sup>20</sup>. Il a été montré que les cellules endothéliales vont réagir à ce type de stress en adoptant un phénotype pro-inflammatoire, par opposition au stress laminaire et non turbulent, qui est davantage anti-inflammatoire [639]. Une étude remarquable montre que deux types de régions artérielles «*athero-prone*» et «*athero-protective*»<sup>21</sup> diffèrent considérablement au niveau de leur organisation du cytosquelette et de leur profil d'expression de gènes lorsque soumises à un stress hémodynamique [640].

---

<sup>20</sup> Ce terme englobe les flux sanguins renversés, les gradients de flux, les flux secondaires avec changement de direction et les zones de turbulence [638].

<sup>21</sup> Régions où l'athérosclérose est promue ou favorisée, par opposition à celles où elle n'est pas favorisée (régions protégées ou résistantes).

Par des mécanismes de mécanotransduction variés impliquant des récepteurs [641] et des molécules d'adhésion [642], les cellules endothéliales vont exprimer des cytokines pro-inflammatoires (MCP-1 [643], IL-8 [640]), des récepteurs à chimiokines (CXCR4 [640]), des PRRs (clairement TLR2 [644, 645], peut-être TLR4 [646]), des MMPs (MMP-1,10 [640]) et des ROS [647, 648] en situation de perturbation de flux. De manière plus importante, il a été montré que NF- $\kappa$ B s'accumulaient spécifiquement dans les noyaux des cellules des régions à risque [640]. Une récente étude utilisant des co-cultures de cellules endothéliales et de VSMC montre que les deux types cellulaires changent de phénotype sous ces conditions [649] (nous discutons du phénotype des VSMC à la section 2.3.1). Ainsi, il semble que ces régions soient stimulées pour mettre en branle un programme pro-inflammatoire qui déterminera l'établissement éventuel de lésions athéromateuses. Elles sont susceptibles par nature.

Tel que présenté aux figures 14 et 15, une caractéristique remarquable et présente dans tous les stades de l'athérosclérose est l'accumulation de lipides. Or, bien que l'implication des lipides, notamment des ox-LDL, dans le développement de l'athérosclérose soit bien reconnue, ce n'est que depuis quelques années seulement que nous sommes éclaircis à propos des mécanismes qui assurent spécifiquement leur rétention au niveau des zones à risque. L'analyse des vaisseaux sanguins d'enfants et de jeunes adultes a suggéré que l'accumulation de lipides pouvait précéder l'accumulation des macrophages [650, 651]. C'est l'étude de la composition de la matrice sous-endothéliale et de son interaction avec l'endothélium qui a permis d'unifier les théories de stress hémodynamiques et les théories d'accumulation lipidique. En effet, les régions soumises à une perturbation de flux présentent une importante variation dans la composition des glycoprotéines et protéoglycanes de la matrice [652, 653]. Non seulement ces glycoprotéines vont interagir avec les lipoprotéines et ainsi favoriser leur accumulation [654], elles vont influencer drastiquement le comportement des cellules endothéliales soumises à un stress hémodynamique [655-657]. Par exemple, il a été montré que la fibronectine et le fibrinogène étaient accumulés *in vivo* dans les zones à risque [652], et que ces composés, et non pas le collagène, étaient essentiels à l'activation des kinases PAK

[655], JNK [657] et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B [652, 656] en situation de perturbation de flux.

Nous avons discuté à la section 1.3.3.1 de la capacité de l'endothélium à contrôler le passage de composés variés par le contrôle de la perméabilité. Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer l'accumulation de lipides dans les zones à risque, notamment les procédés de transcytose [658] et les procédés paracellulaires [659]. Ces derniers semblent être mieux supportés par les récentes évidences expérimentales qui appuient le rôle de PAK dans le contrôle des jonctions serrées [655, 660]. Ainsi, les zones à risque présenteront un endothélium à la fois réactif et perméable, ce qui favorisera autant le recrutement de leucocytes que de lipoprotéines.

Nous ne pourrions terminer cette section sans aborder le modèle «*response to injury*» (réponse à l'injure) de Ross [661]. Ce modèle longtemps accepté était basé sur le fait expérimental qu'une dénudation de l'endothélium avait des répercussions pro-inflammatoires [662-664]. Cependant, *in vivo*, il n'y a pas d'évidence de telles dénudations, sauf dans les plaques complexes et avancées [653]. L'endothélium est intact, bien que modifié (section 1.3.3), dans la grande majorité des stades de développement de la plaque. L'apoptose des cellules endothéliales a également été suspectée d'augmenter la perméabilité des lésions [658, 665]. Or, la mort des cellules endothéliales est un phénomène tardif [658]. Ainsi, les différentes données présentées dans cette section montrent que les phénomènes à la base du développement de l'athérosclérose ne sont pas en faveur d'un phénomène typique d'inflammation aiguë tel que présenté au chapitre 1. Cependant, le développement des lésions sera certes influencé par des réactions inflammatoires locales ou des conditions inflammatoires systémiques, tel que nous le verrons dans les prochaines sections.

### 2.2.2 Les lipides au cœur de l'inflammation

L'athérosclérose est à la fois une maladie inflammatoire et une maladie lipidique, les lipides régulant presque tous les aspects du développement de la pathologie, notamment la réponse inflammatoire et la mort cellulaire. Depuis plusieurs années, les ox-LDL sont reconnus pour être des joueurs majeurs du développement de l'athérosclérose [223]. Définissons d'abord les ox-LDL avant d'aborder les mécanismes pro-inflammatoires qu'ils induisent.

Les ox-LDL sont des LDL qui ont été oxydés par différents mécanismes au niveau de la vasculature. Les LDL ne se font pas oxyder dans le tissu sanguin puisque des mécanismes antioxydants empêchent ces modifications chimiques [666]. Tel que mentionné à la section précédente, les glycoprotéines de la matrice sous-endothéliale retiennent les LDL, ce qui favorisera à long terme leur oxydation [667, 668]. Le mécanisme d'oxydation des LDL reste obscur, mais serait lié au stress oxydatif. Les ox-LDL peuvent être libérés par l'endothélium perméable et rejoindre en petites quantités la circulation sanguine [669]. D'ailleurs, il a récemment été suggéré que les ox-LDL pouvaient être des marqueurs sanguins des maladies cardiovasculaires [223], puisque les plaques athéromateuses précoces les libèrent [670]. De plus, tout porte à croire que ces ox-LDL sanguins, à la manière des cytokines telles que l'IL-6 et le TNF, peuvent agir de manière systémique et exercer des rôles pro-inflammatoires [223] (section 1.5).

Les constituants oxydés des ox-LDL sont reconnus comme des ligands endogènes modifiés par plusieurs récepteurs *scavenger* (section 1.3.2.5 et tableau 1). Le récepteur LOX-1 [671] est actuellement très étudié<sup>22</sup>, et particulièrement intéressant puisqu'inductible en condition inflammatoire et infectieuse [673-678]. Notons que les récepteurs *scavenger*, en plus d'assurer la prise de lipides, peuvent induire des signalisations pro-inflammatoires variées [679, 680]. Il est maintenant reconnu que les ox-LDL induisent l'activation de nombreux facteurs de transcription pro-inflammatoires tels

---

<sup>22</sup> Il existe une controverse quant aux rôles respectifs des différents récepteurs *scavenger* dans l'athérosclérose [672].

que NF- $\kappa$ B [681, 682], AP-1 [683] STAT3 [684] et HIF-1 $\alpha$  [588] (revu dans [685]). Les ox-LDL modulent également la perméabilité endothéliale [686, 687].

L'un des aspects les mieux documentés de l'athérosclérose est la formation de cellules spumeuses [688]. Les macrophages phagocytent les lipides et certains deviennent des cellules spumeuses, caractérisées par l'accumulation de lipides intracellulaires. Les cellules spumeuses s'agglomèrent et forment progressivement le cœur lipidique des plaques avancées. Or, les macrophages des plaques tardives sont incapables d'efférocytose [689] (section 1.3.4), et les cellules apoptotiques iront conséquemment en nécrose secondaire pro-inflammatoire (section 1.3.1.1). De ce fait, le cœur lipidique est également appelé cœur nécrotique. Cette agglomération complexe de lipides sera la source de débris cellulaires agissant potentiellement comme DAMPs (figure 2), de lipides pro-inflammatoires, mais également du facteur tissulaire (voir note #17 au bas de la page 48), ce qui rend le cœur nécrotique responsable de la majorité des cas d'athéromatose.

Finalement, il est depuis longtemps reconnu que les plaques athéromateuses avancées contiennent de gros cristaux de cholestérol [617]. Différents types de cristaux participent à la progression de maladies inflammatoires chroniques telles que la goutte [19]. Une étude récente montre que ces cristaux sont formés rapidement et sont présents à tous les stades du développement de la plaque [106]. Les cristaux de cholestérol sont reconnus par l'inflammasome NALP3 (figure 6), ce qui permet une induction d'IL-1 $\beta$ .

## **2.2.3 L'inflammation sous la rupture de la plaque**

### **2.2.3.1 Vulnérabilité de la plaque**

Le développement de l'athérosclérose peut être asymptomatique jusqu'à la rupture (ou fissure) des plaques, qui mène à l'athéromatose et à ses conséquences cliniques délétères, tel que discuté précédemment. L'évaluation de l'état de vulnérabilité des plaques



et des marqueurs associés s'avère être un outil précieux pour évaluer la disposition des patients à subir un accident vasculaire. Il existe actuellement plusieurs techniques d'imagerie afin de diagnostiquer les lésions vulnérables [690]. Les plaques vulnérables présentent des caractéristiques précises dont celles-ci :

- Un cap fibreux mince, qui sera susceptible de rupture par stress mécanique [691-693]
- Un cœur nécrotique large avec un ratio de cholestérol libre/estérifié élevé et une activité élevée du facteur tissulaire [694-696];
- Un degré élevé d'inflammation dans la plaque, qui entraînera une production de métalloprotéases de la matrice (MMPs) variées qui contribueront à dégrader le cap fibreux déjà mince [697];
- Un remodelage vasculaire, qui permet notamment la formation de cœurs lipidiques plus larges [698, 699];
- Une néo-vascularisation dans la plaque et issue des vasa vasorum, qui pourrait permettre le recrutement de cellules pro-inflammatoires dans les lésions avancées [303, 700];
- Des hémorragies dans les plaques, qui libèrent des globules rouges et des hémoglobines pro-inflammatoires [690]

#### **2.2.3.2 Causes de rupture**

Nous pouvons expliquer d'un point de vue moléculaire deux facteurs qui peuvent contribuer à la rupture de la plaque athéromateuse avancée : 1-la dégradation du cap fibreux sous-endothélial, et 2- l'apoptose. Le destin de la plaque dépend en fait d'une balance entre la synthèse et la dégradation de matrice extracellulaire [701]. Les macrophages et les VSMC contribuent significativement à la dégradation de matrice en sécrétant des MMPs

[702]. L'expression de plusieurs MMPs est sous le contrôle des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B (revu dans [703] et [704]). Par exemple, les inducteurs des ROS [705, 706], le TNF [707] et l'IL-1 $\beta$  [708] induisent des MMPs et peuvent donc contribuer à la rupture des plaques. Les ox-LDL induisent également l'expression de MMP-1 et MMP-9 dans les cellules endothéliales et les macrophages [709, 710]. Comme nous l'avons mentionné dans la section précédente, le cœur nécrotique contient une grande quantité de cellules apoptotiques dont l'efférocytose n'a pas été effectuée. La nécrose secondaire étant pro-inflammatoire, il est cru que qu'elle influencera la déstabilisation de la plaque athéromateuse [711].

### **2.2.3.3. Implications d'autres types cellulaires**

Une grande quantité de cellules immunitaires spécialisées sont retrouvées dans les plaques athéromateuses et peuvent contribuer à leur progression ou à leur rupture. Les neutrophiles, par exemple, sont accumulés à proximité des caps fibreux dans les plaques athéromateuses de souris [712]. Ces leucocytes sont cependant difficiles à détecter dans les plaques athéromateuses puisqu'ils ont une très courte durée de vie et qu'ils ont la capacité d'imiter les macrophages et les cellules dendritiques [713]. L'arsenal libéré par le neutrophile par dégranulation, tel que discuté à la section 1.3.4, contient des MMPs, des peroxydases et des ROS qui pourront toutes contribuer à aggraver l'inflammation locale [714]. Par exemple, la myéloperoxydase (MPO) libérée par les neutrophiles peut générer de l'acide hypochloreux (HOCl), reconnu pour entraîner la desquamation de l'endothélium suite à l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales [715]. Le taux sanguin de MPO est d'ailleurs un important prédicteur des infarctus du myocarde [716]. L'érosion superficielle de l'endothélium n'occasionne pas en soi la rupture de la plaque, mais peut contribuer de manière significative à la thrombogénèse. Mentionnons que la rupture des plaques est la cause la plus commune d'athérothrombose (environ 75% des événements [717]), alors que l'érosion des plaques en serait la deuxième [718].

Les cellules T sont également retrouvées dans tous les stades de l'athérosclérose [719]. Les cellules T dont le rôle pro-athérogénique est le mieux caractérisé sont les cellules CD4<sup>+</sup> Th1. Leur action pro-athérogénique dépend en grande partie de leur capacité à sécréter l'IFN $\gamma$ . Cette cytokine a la capacité d'induire l'athérosclérose dans des modèles murins [720], et ce, en absence de leucocytes [721]. Inversement, l'inhibition de l'IFN $\gamma$  diminue la taille des plaques athéromateuses [722]. Bien reconnu pour activer les cellules inflammatoires dont le macrophage, l'IFN $\gamma$  diminue de surcroît la prolifération des VSMC, leur production de matrice extracellulaire et stimule leur sécrétion de MMPs, ce qui favorisera la fragilisation de la plaque [723]. Les cellules dendritiques (DC) sont retrouvées en contact étroit avec les cellules T dans les plaques athéromateuses [724]. Les DC sont des cellules présentatrices d'antigènes qui activent les cellules T, entraînent leur production de l'IFN $\gamma$  [725] et stimule leur expansion clonale, visible dans les plaques [726]. Les DC sont retrouvés en deux sous-types principaux chez l'humain : les myéloïdes (mDC) et les plasmacytoïdes (pDC). Ces derniers expriment les TLR7-9 et sont donc sensibles à la détection de matériel génétique (pathogène ou endogène), mais se caractérisent surtout par leur capacité à induire l'IFN $\alpha$ , un IFN de type 1 (que nous abordons à la section 3.3.1 et au tableau 3) [727, 728]. Mentionnons pour le moment que l'IFN $\alpha$  favorise entre autres les activités cytotoxiques des cellules T CD4<sup>+</sup> envers les VSMCs [367], et peut induire l'expression de TNF- $\alpha$ , de TLR4 et de MMP-9 chez certains types cellulaires [368]. L'IFN $\alpha$  peut donc contribuer à entretenir l'inflammation et favoriser la rupture de la plaque.

#### **2.2.3.4 Rôle de la réponse hypoxique**

Finalement, l'hypoxie, de même que différents facteurs retrouvés dans les plaques athéromateuses, peut induire l'activation de HIF-1 et la production de VEGF (section 1.6.1) et ainsi moduler l'angiogenèse. La présence spécifique de néo-vaisseaux dans les plaques athéromateuses a été notée dès 1936 [301]. Il est maintenant connu que l'angiogenèse est

retrouvée dans tous les stades de développement de l'athérosclérose, mais est considérablement enrichie dans les plaques avancées et vulnérables [303, 729]. À l'aide de différentes techniques, il est maintenant possible de montrer la présence d'hypoxie dans les plaques [300]. L'hypoxie se situe dans les lésions humaines à 100-250µm de la lumière des vaisseaux sanguins, et est dépendante de la diffusion de l'oxygène [301]. Cependant, les cellules spumeuses sont hypoxiques et situées à 20-30µm de la lumière. Il appert donc que les cellules résidentes des plaques athéromateuses soient hypoxiques à cause de leur haute demande énergétique et leur consommation accrue d'oxygène. La réponse hypoxique induit l'activation de nombreuses cellules immunitaires, dont les macrophages et les DC [730], ce qui favorisera l'expression de PRRs et la production de composés impliqués dans la rupture de la plaque, notamment les MMPs [731] (voir figure 10). La formation de néo-vaisseaux pourrait contribuer à recruter des cellules pro-inflammatoires dans les plaques au niveau des zones fragiles et ainsi favoriser leur rupture [700]. Ces néo-vaisseaux expriment d'ailleurs en quantité des molécules d'adhésion telles que ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine [732]. Finalement, des données intéressantes montrent que l'hypoxie induit la production de ROS [733], et favoriserait la prise de LDL ainsi que leur oxydation par les macrophages [734-736]. Ces évidences combinées montrent que la réponse hypoxique est un joueur majeur du développement de l'athérosclérose.

## **2.3 La cellule musculaire lisse vasculaire**

### **2.3.1 Les phénotypes contractiles et synthétiques**

Le laboratoire de Marc Servant s'intéresse particulièrement aux mécanismes moléculaires à la base du comportement pro-inflammatoire des VSMC, cellules impliquées à tous les niveaux du développement des plaques athéromateuses (revu dans [737] et [738]). Tel que présenté à la figure 14, les VSMC forment dans l'artère normale la couche

média, et leur action principale est d'assurer le contrôle du tonus des vaisseaux sanguins en réponse aux besoins métaboliques des mammifères. Les VSMC forment avec les cellules endothéliales un microsystème complexe et hautement régulé. La contraction des VSMC est contrôlée par les médiateurs chimiques libérés par les cellules endothéliales. En réponse au flux laminaire sanguin [739] ou à l'acétylcholine [740], les cellules endothéliales génèrent du NO<sup>23</sup> à partir de la L-arginine [744] via l'activation de la eNOS. Le NO diffuse dans les VSMC voisines et active la guanylate cyclase pour induire la production de GMPc [745]. Le GMPc entraîne une diminution de Ca<sup>2+</sup> cytosolique dans les VSMC, et ceci contribue à leur relaxation [746]. Nous appelons ce mécanisme « vasodilation NO-dépendante ». Inversement, l'angiotensine II [747], l'endothéline [748] et le thromboxane A2 [749] induisent la contraction des VSMC et la vasoconstriction. Les VSMC médiales sont donc de phénotype contractile, et nous les appelons « différenciées », puisqu'elles ne ressemblent plus à leurs cellules progénitrices. Or, l'étude des VSMC des plaques athéromateuses, enrichies au niveau de la néo-intima (figure 14), a montré que ces cellules ne sont plus contractiles. Elles ont acquis la capacité de migrer, de proliférer et de sécréter des composantes de la matrice extracellulaire. Ces cellules sont de phénotype « synthétique » et sont « dédifférenciées », puisqu'elles ont perdu leur phénotype habituel et ressemblent davantage à leurs progénitrices. En effet, lors de la vasculogenèse, les VSMC sont dynamiques et participent activement à la formation des vaisseaux en collaboration avec les cellules endothéliales [750-752]. Les néo-vaisseaux typiques des plaques athéromateuses (vus précédemment) et cette dédifférenciation des VSMC représentent possiblement des exemples de tentatives de réparation utiles, mais qui s'avèrent à avoir des conséquences délétères lors de l'inflammation chronique. Nous avons répertorié quelques différences phénotypiques entre les VSMC contractiles et sécrétrices au tableau 6.

---

<sup>23</sup> Lorsque produit en grande quantité, le NO a des propriétés cytotoxiques [741] et antimicrobiennes [742], mais peut également contribuer au choc septique [743], ce qui fait de lui une arme à deux tranchants, tout comme la plupart des médiateurs de l'inflammation.

### 2.3.2 Origine des VSMC de la néo-intima

Plusieurs publications d'impact majeur ont tenté de déterminer l'origine des VSMC qui forment la néo-intima, mais sont parvenus à des résultats différents. Il est généralement admis que les VSMC de la néo-intima proviennent des cellules quiescentes de la média [753]. Or, plusieurs études ont montré que les VSMC néo-intimales provenaient de cellules progénitrices sanguines issues de la moelle osseuse [754, 755]. Ces résultats ont été contredits par d'autres études qui stipulent que ces cellules proviennent des vaisseaux sanguins locaux [756, 757]. Enfin, d'autres évidences suggèrent la présence de cellules progénitrices au sein des vaisseaux sanguins [758, 759]. De plus, certaines cellules telles que les myofibroblastes expriment des marqueurs des VSMC, par exemple l' $\alpha$ -SMA (*smooth muscle cell actin*), et peuvent ainsi être considérées à tort comme des VSMC [760].

Les myofibroblastes proviendraient de la différenciation des fibroblastes de l'adventitia et composeraient une partie importante de la néo-intima [761-764]. L'importance de l'adventitia dans l'athérosclérose est certes considérable et a été revue ailleurs [765]. Quoiqu'il en soit, les VSMC de la néo-intima sont d'origine monoclonale ou oligoclonale [766, 767], ce qui suggère qu'un type précis de VSMC est spécifiquement induit pour participer à un processus résolution quelconque [768].

### 2.3.3 Plasticité et rôles inflammatoires des VSMC

Les VSMC sont d'une étonnante plasticité. Lorsque mises en culture, elles se dédifférencient spontanément [769], et ne peuvent être différenciées que pour une durée limitée en présence de certains composés (acide ascorbique [770], rapamycine [771], insuline [772], une combinaison de laminine et d'IGF-I [773]), ou lorsque mises en co-culture avec des cellules endothéliales [774, 775]. Il a cependant été montré récemment que la différenciation était soutenue en présence d'une matrice physiologique et la présence de l' $\alpha$ 7-intégrine sur les VSMC [776].

	Phénotypes	
	Contractiles (différenciées)	Synthétiques (dédiﬀérenciées)
$\alpha$ -SMA (vasculaire)	↑	↓
SM22	↑	↓
Metavinculine	↑	↓
Myosine	↑	↓
Calponine	↑	↓
$\beta$ -tropomyosine	↑	↓
intégrine A1	↑	↓
ECM	faible Collagène IV, laminine	élevée Collagène III, fibronectine
MMPs	↓ MMPs, ↑ TIMPs	↑ MMP-1/3
Migration	-	+
Prolifération	-	+
Contractilité	+	-
Morphologie	Petite, allongée	Grosse, hypertrophique

**Tableau 6 : Exemples de marqueurs et caractéristiques des VSMC.**

Nous avons répertorié différents marqueurs des VSMC [777, 778]. Nous pouvons remarquer que les cellules différenciées expriment des protéines impliquées dans la contraction musculaire, alors que les cellules dédifférenciées sont synthétiques, mobiles et hautement prolifératives. Différents mécanismes sont à la base du contrôle des phénotypes. Par exemple, le miRNA-145 est spécifiquement exprimé dans les cellules différenciées et induit l'expression de la SMA, de la calponine et des myosines [779]. La protéine SM22 quant à elle diminue la prolifération des VSMC en inhibant la voie Ras-MEK-ERK [780]. Le changement phénotypique des VSMC est induit par de nombreux facteurs, tel que discuté dans le texte. Se référer à la liste d'abréviations en début de thèse.

Par ailleurs, l'étude phénotypique des VSMC en culture a montré qu'il existait deux principaux types de VSMC chez les plusieurs mammifères : les VSMC *spindle* et les VSMC épithélioïdes/rhomboïdes [781]. Comparativement aux VSMC *spindle*, les VSMC épithélioïdes ont une capacité accrue à proliférer, à migrer, peuvent vivre en absence de sérum, cessent de croître à confluence et sont sensibles à l'apoptose (revu dans [781]). Elles présenteraient également une plus forte expression de NF- $\kappa$ B [782]. Cependant, les VSMC *spindle* seraient plus sensibles à différents composés tels que l'endothéline-1 (ET-1) [783] et l'angiotensine II (AngII) [784]. Suivant leur mise en culture, il est généralement admis que les VSMC adoptent un phénotype dédifférencié et donc propice à l'étude du comportement des VSMC de la néo-intima. Cependant, les caractéristiques mentionnées plus haut semblent montrer que les VSMC épithélioïdes correspondent mieux aux VSMC de la néo-intima. Il est intéressant de constater que chez le rat, les VSMC prédominantes en bas âge sont les VSMC *spindle* [785, 786] et que celles-ci deviendraient minoritaires avec l'âge [787-789]. Cependant, les différents types de VSMC sont interchangeables chez des espèces comme le porc [790]. Bien que différentes populations de VSMC aient été isolées à partir de plaques athéromateuses humaines [791], nous ne savons pas à l'heure actuelle quelle est la contribution relative des différents sous-types de VSMC dans le développement de l'athérosclérose.

L'étude des mécanismes à la base de la dédifférenciation des VSMC (parfois nommée « activation ») est importante puisque les VSMC jouent un rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose. Au fil des ans, de multiples facteurs ont été reconnus pour avoir la capacité d'induire la dédifférenciation des VSMC [773]. Comme nous l'avons mentionné au chapitre 1, les macrophages ainsi que d'autres types cellulaires du foyer inflammatoire produisent de grandes quantités de cytokines, d'éicosananoïdes et de facteurs de croissance. Le PDGF [772, 792], le LPA [793, 794], la PGE<sub>2</sub>, l'IL-1 $\beta$  [795], les lipides oxydés [796] et l'AngII [797] sont des inducteurs reconnus de la dédifférenciation. Par ailleurs, il a été montré que les VSMCs pouvaient par elles-mêmes contribuer à leur dédifférenciation en sécrétant de manière autocrine ou paracrine l'épiréguline [798] et MCP-1 [351].



En plus de former la néo-intima grâce à leurs activités migratrices, les VSMC peuvent contribuer à plusieurs niveaux à la progression de l'athérosclérose. Elles expriment de nombreux récepteurs à lipides, ce qui favorise leur migration [799, 800] et la formation de VSMC spumeuses [801, 802]. Elles favorisent la rétention des leucocytes dans la plaque grâce à l'expression inductible des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 [803-805] (tableau 2). De plus, elles ont la capacité de produire de nombreuses cytokines (tableau 3, revu dans [737]). Finalement, les VSMC contrôlent la formation et la dégradation du cap fibreux, en produisant d'une part de grandes quantités de collagène [806], et d'autre part en produisant des protéases, dont les MMP-1,-2,-3 et -9 [807-809].

## 2.4 Facteurs de risque de l'athérosclérose

Suite aux études épidémiologiques pionnières des maladies du cœur par la *Framingham Study*, de nombreux facteurs de risque ont été associés au développement de l'athérosclérose. D'ailleurs, un nombre considérable de publications suggèrent des facteurs de risque « indépendants », ce qui signifie qu'ils augmentent le résultat attendu (ex : le développement des plaques ou l'athéromatose) dans un contexte fixe et bien contrôlé d'autres facteurs de risque (*Ceteris paribus sic stantibus*). Cependant, l'établissement de l'indépendance d'un facteur de risque ne signifie pas que ce facteur est nécessairement un agent causal de la maladie [810]. Il pourra agir en tant que variable indépendante et aggraver le développement pathologique.

De nombreux facteurs de risque de l'athérosclérose sont modifiables par le régime de vie : l'obésité [811], les taux de triglycérides [812] et de glucose [813] sanguins, l'hypertension [814] (qui composent tous ensemble les critères diagnostiques du syndrome métabolique [815]) et le tabagisme [816] en sont des exemples. D'autres ne sont pas modifiables : l'âge, le sexe et les antécédents familiaux [817]. Nous allons discuter dans cette section de deux facteurs de risque de l'athérosclérose. L'un est un facteur de risque reconnu (ou *classique*), l'hypertension. Le deuxième est un facteur *émergeant*, dont

l'association à l'athérosclérose est controversée : l'infection par des pathogènes (nous parlerons de séropositivité). Plus précisément, nous allons étudier les bases moléculaires de ces facteurs de risque, en prenant pour exemple l'AngII, dont le rôle dans l'hypertension est indiscutable, et le cytomégalovirus humain (HCMV), dont la séropositivité a été associée au développement de l'athérosclérose.

### **2.4.1 Rôles pro-inflammatoires de l'Angiotensine II**

Depuis la découverte et la caractérisation des composantes principales du système rénine-angiotensine (RAS)<sup>24</sup>, un nombre considérable d'études a montré que ce système n'était pas seulement impliqué dans le contrôle de la pression sanguine et des électrolytes [819, 820], mais également dans le remodelage vasculaire (hypertrophie [821] et fibrose [822]), l'hypertension [823] et l'athérosclérose [824]. Nous nous limiterons dans cette section aux rôles pro-inflammatoires de ce système. Nous allons décrire ses composantes principales, puis allons discuter de quelques études cliniques et expérimentales liant ce système à l'athérosclérose et ses complications, avant d'aborder les voies moléculaires pro-inflammatoires modulées par l'AngII dans les VSMC.

#### **2.4.1.1 Les différents systèmes rénine-angiotensine (RAS)**

Les recherches des dernières années ont montré l'existence de trois RAS indépendants. Le premier est le RAS classique ou endocrine, où l'angiotensinogène (AGT) est produit par le foie pour rejoindre la circulation sanguine (figure 16). La rénine (et la pro-rénine) est principalement produite et sécrétée par les reins en réponse à des fluctuations de pression sanguine, de la natrémie, ou sous l'effet du système nerveux sympathique et de nombreuses hormones [825]. Cette enzyme clive l'AGT pour produire

---

<sup>24</sup> L'historique du RAS a été décrite dans un article de revue [818].

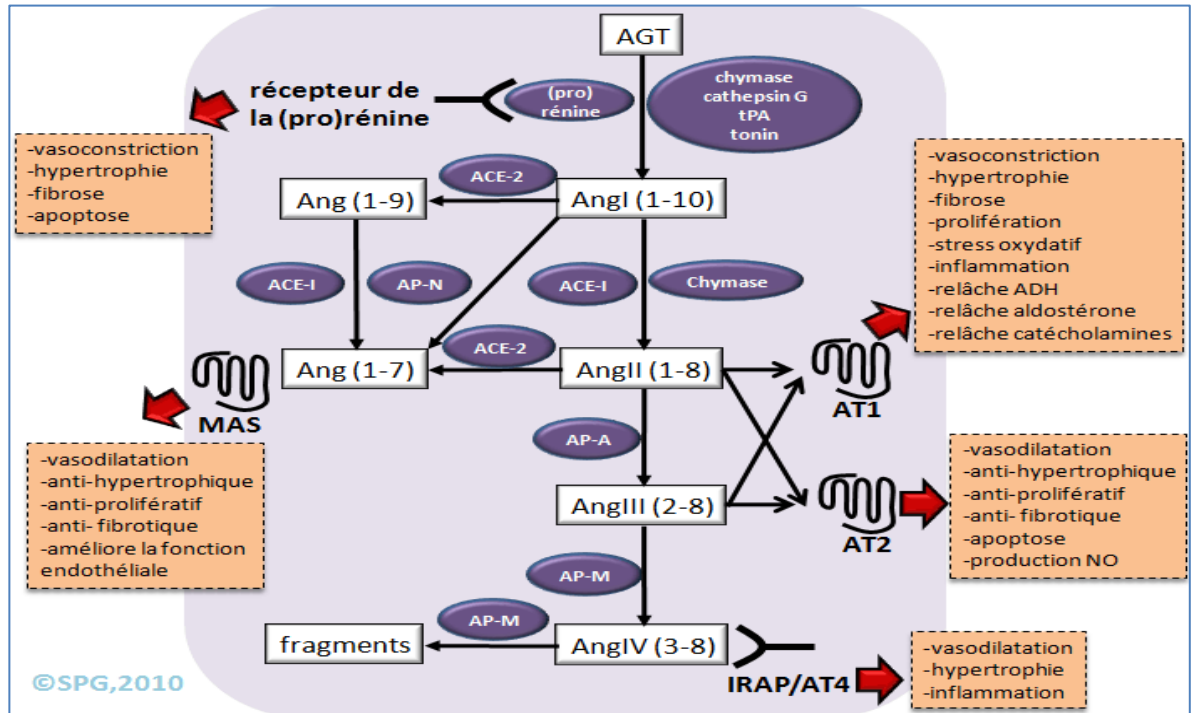
l'angiotensine I (AngI). L'AngI est clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine 1 (ACE-1), qui est principalement exprimée à la surface de l'endothélium vasculaire. Le produit libéré est l'AngII, un octapeptide qui a des propriétés d'hormone, de facteur de croissance et de cytokine. C'est principalement de lui dont nous allons discuter, bien que les autres produits dérivés du RAS aient des rôles importants dans le contrôle des processus inflammatoires (figure 16). L'AngII exercera un rétrocontrôle en inhibant la production de rénine [825].

L'AGT est régulé de manière transcriptionnelle par les hormones stéroïdiennes et les glucocorticoïdes [826], les voies TNF/NF- $\kappa$ B [827] et IL-6/STAT-3 [828], de même que par la voie AngII/NF- $\kappa$ B [829], qui nous est chère. La voie IFN $\gamma$ /STAT-1 peut également induire AGT [830]. Il apparaît donc que l'AGT est intimement lié aux processus inflammatoires<sup>25</sup>. La conversion de l'AGT en AngI par la rénine étant limitante, de fines modulations du niveau sanguin d'AGT pourront avoir des effets marqués sur la concentration d'AngII circulante [832].

Le deuxième RAS est le RAS tissulaire, ou RAS local, qui agit de manière autocrine ou paracrine. Nous avons identifié au tableau 7 les différentes composantes de ce système, ainsi que leur expression cellulaire, et avons mis en relief quelques études qui suggèrent l'inductibilité de ce système. L'existence d'un RAS local a été mise en évidence à l'aide d'animaux génétiquement modifiés pour exprimer certaines composantes du RAS de manière tissu-spécifique. Par exemple, la création de souris n'exprimant l'AGT que dans le foie et le cerveau a montré que les dommages (hypertrophie/fibroses) du cœur, occasionnés par l'hypertension, étaient moindres par rapport aux souris parentales, et ce, pour une hypertension similaire dans les 2 modèles de souris [833]. Cette expérience ainsi que d'autres suggèrent qu'il existe un système local indépendant dont l'activation peut avoir des effets délétères. L'importance de ce RAS local a entre autres été mise en relief dans le tissu adipeux [834], le cœur [835], le pancréas [836] et le tissu vasculaire [837]. Un RAS local est également modulé dans le microenvironnement des tumeurs [838, 839].

---

<sup>25</sup> L'AGT n'est pas considéré comme une protéine typique de la phase aigüe [831].



**Figure 16 : Vision actuelle du système rénine-angiotensine (RAS).**

Différents produits de maturation de l'AGT exercent des effets multiples au niveau de plusieurs organes [840, 841]. Les thérapies anti-hypertensives actuelles visent les actions de l'AngII en inhibant ACE-I (ex : Captopril [842]), ou en agissant au niveau du récepteur AT1 (ex : Losartan [843]). Contrairement à l'inhibition d'ACE-I, le blocage d'AT1 n'élimine pas la présence de l'AngII, qui peut alors exercer ses effets sur le récepteur AT2, aux rôles approximativement contraires à ceux d'AT1 [430]. De plus, les produits de maturation de l'AngII, soit l'AngIII et l'AngIV pourront être générés. AngIII serait rapidement dégradée [844]. Cependant, des études récentes montrent que l'AngIV aurait des effets pro-inflammatoires en activant NF- $\kappa$ B et en induisant l'expression de MCP-1, de l'IL-6 et du TNF [840]. D'autres enzymes peuvent participer à la maturation de l'AGT, notamment la chymase, produite par les mastocytes et d'autres cellules [845]. ACE-2<sup>26</sup> favorise la formation de l'Ang(1-7), qui exerce des effets similaires à ceux d'AT2 via le récepteur MAS [847]. Le récepteur de la (pro)rénine favorise la rétention de la (pro)rénine au niveau tissulaire, active la (pro)rénine et induit des voies de signalisation variées [848]. Nombre d'études ont d'ailleurs suggéré l'inhibition pharmacologique de la rénine comme traitement anti-hypertenseur (ex : Aliskiren [849]). En effet, l'inhibition de ACE-I empêche le rétrocontrôle de l'AngII sur la production de rénine et augmente ainsi le taux de rénine plasmatique [850].

<sup>26</sup> ACE-2, qui a une fonction protectrice dans les poumons, est un récepteur essentiel du SRAS [846], ce qui explique les troubles respiratoires causés par ce virus en 2003.

	Types cellulaires	Induction
<b>Angiotensinogène</b>	VSMC [851], EC [852], LT, NK [853]	acide urique [851, 852], insuline [854], EPO [855], TGF $\beta$ /HIF-1 (poumons) [856]
<b>Pro-rénine</b>	VSMC [855], EC [857], LT, NK [853]	EPO [855]
<b>Récepteur de la (pro)rénine</b>	VSMC [858], EC [859], LT, NK [853]	?
<b>ACE-1</b>	EC [860], VSMC [514], AF [861], M $\phi$ [862], LT, NK [853], DC [863]	hypoxie/HIF-1 [514, 861], aldostérone/JAK2 [860], acide urique [852]
<b>Chymase</b>	Mastocytes [864], VSMC [865]	AGEs/RAGE/ERK [865]
<b>AT1</b>	VSMC [866], EC [867], AF [861], M $\phi$ [862], LT, NK [853]	IL-6 [866], hypoxie [861], acide urique [852], EPO [855], LPS [868]
<b>AngII (cytosolique ou extracellulaire)</b>	EC [852], VSMC [851, 869]	glucose élevé [869], acide urique [852], insuline [854]

**Tableau 7 : Expression des composantes du RAS local au niveau des vaisseaux sanguins.**

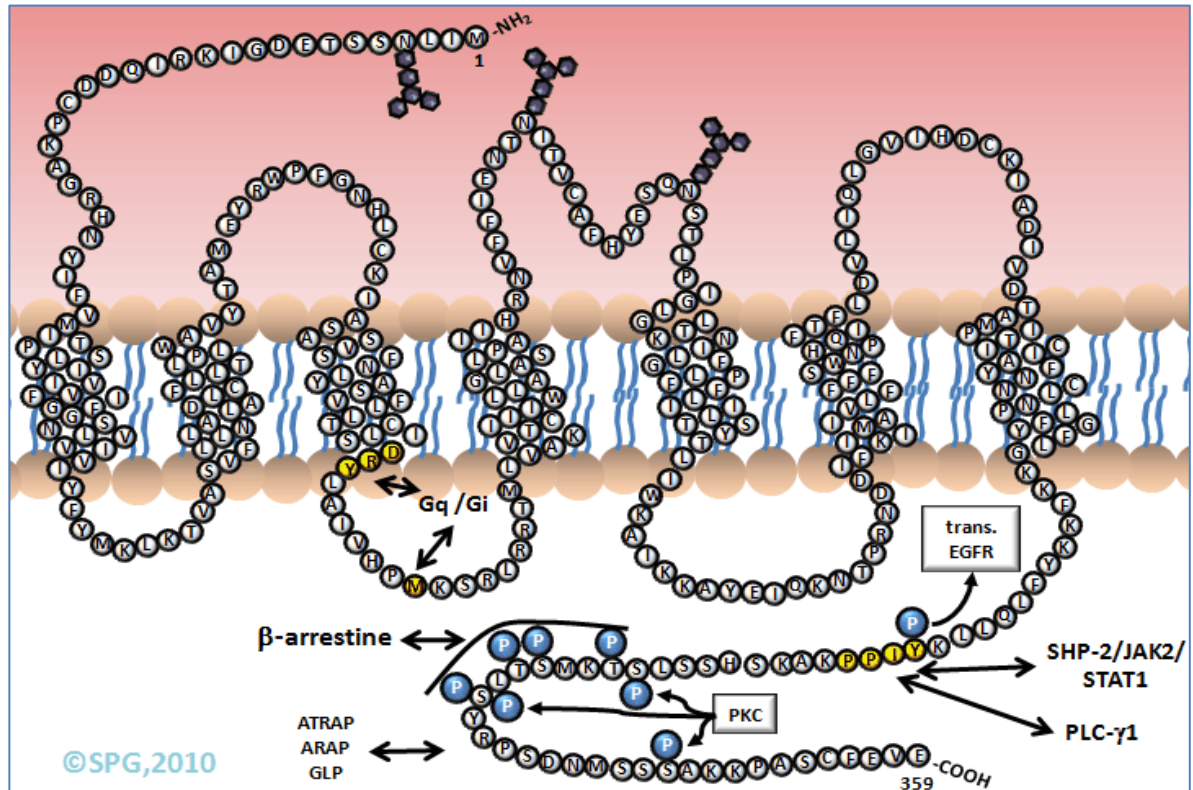
Plusieurs composantes du RAS sont présentes dans les types cellulaires locaux des vaisseaux sanguins. Une étude montre que le système RAS local est induit en condition d'athérosclérose in vivo [837]. L'acide urique est depuis quelques années pointé comme un nouveau marqueur des maladies cardiovasculaires [870]. L'acide urique dans la plaque est cependant peu concentré [871] et plus d'analyses sont nécessaires, notamment pour y déterminer la présence de cristaux d'acide urique. Rappelons que ces cristaux activent l'inflammasome NALP3 (section 1.3.2.4) [108]. Puisque l'hypoxie induit également l'expression d'ACE-1 et d'AT1, il serait intéressant d'étudier l'effet de cette dernière sur l'expression du RAS présent dans le microenvironnement des tumeurs [839]. AF : fibroblastes de l'adventitia de l'artère pulmonaire; LT : lymphocyte T; NK : *natural killer cell*; M $\phi$  : macrophage. Se référer à la liste d'abréviations placée en début de thèse.

Finalement, un troisième RAS existe, le RAS intracellulaire ou intracrine, et dont le rôle n'est pas encore bien caractérisé. Une équipe a montré que l'addition d'AngII à des

noyaux provenant de cellules corticales rénales de rat induisait la transcription de MCP-1 via AT1 [872]. Une étude similaire et plus récente effectuée dans des noyaux de myocytes a montré une induction transcriptionnelle via les récepteurs AT1 et AT2 de la membrane nucléaire [873]. En induisant l'expression de l'AngII intracellulaire à l'aide de vecteurs adénoviraux dans des myocytes, ou in vivo à l'aide de liposomes dans des cœurs de souris, une autre équipe a montré que l'AngII intracellulaire avait des effets hypertrophiques [874]. De plus, il a récemment été montré qu'ACE-I peut être internalisée et être localisée dans le noyau des VSMC [875].

#### 2.4.1.2 Récepteurs de l'angiotensine II

Il existe 2 récepteurs de l'AngII chez l'humain, le récepteur AT1 et le récepteur AT2, qui partagent 34% d'homologie [876]. Nous ne discuterons pas de manière détaillée d'AT2 dans cet ouvrage. Ce récepteur a habituellement des effets opposés à ceux d'AT1 [877], qu'il antagoniserait [878]. Chez d'autres espèces comme le rat, il existe 2 types d'AT1, soit AT1a et AT1b, dont la pharmacologie est grandement similaire [879]. Nous avons illustré à la figure 17 quelques faits saillants de la structure d'AT1. Notons que ce récepteur lie également l'AngIII (figure 16). Le récepteur AT1 a la capacité de transactiver plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) tels que le récepteur de l'EGF (EGFR), le récepteur du PDGF (PDGFR) et le récepteur de l'*insulin-like factor* (IGFR) (revu dans [880]). La transactivation implique de nombreuses voies de signalisation de même que le motif YIPP de la queue C-terminale cytosolique d'AT1 (figures 17 et 18). La transactivation de RTK est commune chez les GPCR (section 1.4.2). La transactivation de l'EGFR [881] du PDGFR [882] et de l'IGFR [883] explique en partie les effets hypertrophiques de l'AngII au niveau du tissu vasculaire et du remodelage cardiaque [884]. De plus, l'EGFR et le PDGFR sont impliqués dans la migration des VSMC induite par l'AngII [885]. Par ailleurs, l'AngII inhibe IRS-1 (*insulin receptor substrate-1*) [886, 887], une composante essentielle de la signalisation de l'insuline, ce qui expliquerait peut-être ce lien si étroit entre le diabète et l'hypertension (revu dans [888]).



**Figure 17 : Le récepteur AT1 humain de l'angiotensine II (et III).**

Le récepteur AT1 est un récepteur à sept passages transmembranaires couplé aux protéines G (GPCR). La 2<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur contient des acides aminés importants (motif DRY) pour la liaison des protéines G hétérotrimérique  $G_{\alpha}G_{\beta\gamma}$  [889, 890]. Ce GPCR est principalement couplé à  $G_{q/11}$ , de même qu'à  $G_i$  [890]. AT1 est reconnu pour transactiver différents récepteurs dont l'EGFR (voir texte et figure 18). La phosphorylation du domaine YIPP est nécessaire à la transactivation (trans.) de l'EGFR [884, 891], l'activation de la voie JAK-STAT [892] et de la PLC- $\gamma$ 1 [893]. La queue C-terminale cytosolique du récepteur est possiblement phosphorylée par une PKC [894] et les GRK2/3 [895], et ces phosphorylations sont nécessaires au recrutement de  $\beta$ -arrestine.  $\beta$ -arrestine est impliquée dans l'internalisation du récepteur via le complexe ARF6/AP-2 [896], l'activation de ERK [897], de voies anti-apoptotiques [898] et le chimiotactisme [899]. D'autres molécules s'associent à la queue C-terminale pour moduler positivement (ARAP1, GLP) ou négativement (ATRAP) la signalisation du récepteur [880]. Finalement, le récepteur contient trois sites consensus de N-glycosylation [900], et sa glycosylation est apparente par essai SDS-PAGE à cause d'un retard sur gel. La présence de ponts disulfures est importante pour la liaison de l'AngII (non montré) [901]. Nous ne pouvons pas illustrer sur ce schéma bidimensionnel les domaines d'interaction avec ses ligands (voir [902, 903]).

#### 2.4.1.3 Signalisation pro-inflammatoire du récepteur AT1

L'AngII exerce des effets physiologiques sur les VSMC en induisant leur contraction. À cet effet, elle induit l'activation de phospholipases qui sont impliquées dans la régulation des chaînes de myosine et la production d'éicosanoïdes (revu dans [904]). L'AngII a également des propriétés de facteur de croissance et de cytokine, et pourra induire l'hypertrophie des VSMC ainsi que la production de matériel pro-inflammatoire sous certaines conditions. Comme nous l'avons mentionné précédemment, le RAS local est à l'œuvre dans les vaisseaux sanguins et participe probablement à des processus de résolution et de réparation. Par exemple, l'AngII peut induire les processus de réparation par fibrose, indépendamment du TGF- $\beta$  [905, 906], une cytokine pro-fibrotique majeure [907]. Cependant, en condition inflammatoire chronique, l'AngII participe à la détérioration du tissu et altère considérablement sa fonction. Par exemple, il est maintenant reconnu que l'AngII est responsable de la dysfonction endothéliale, une étape initiatrice de l'hypertension et de l'athérosclérose [430]. Elle contribue entre autres à la fibrose, aux dommages cellulaires, à l'oxydation des lipoprotéines [908, 909] et leur ingestion (formation de cellules spumeuses [910, 911]), et participe à la rupture des plaques athéromateuses [912, 913].

Le rôle de l'AngII dans le développement de l'athérosclérose a été solidifié par l'utilisation d'inhibiteurs des ACEs et des bloqueurs du récepteur AT1 chez l'humain et dans des modèles animaux. Les études cliniques SAVE, SOLVD, HOPE et EUROPA, par exemple, ont toutes montré une diminution des incidents cardiovasculaires de l'ordre de 20-25% chez des patients à risque grâce à l'inhibition des actions de l'AngII (revu dans [914]). Il a été montré que l'utilisation de bloqueurs du récepteur AT1 [915] ou d'inhibiteurs d'ACE-1 [916, 917] dans des souris apoE<sup>-/-</sup> diminuait considérablement la taille des lésions athéromateuses. Ces résultats ont été répétés à l'aide d'autres modèles animaux (revu dans [824]). Dans ce même modèle murin, la délétion d'AT2 favorise le développement de l'athérosclérose [918], ce qui montre que ce récepteur antagonise l'AT1 et que ce dernier est responsable des effets pro-inflammatoires de l'AngII.



Nous avons illustré à la figure 18 quelques voies de signalisation pro-inflammatoires de l'AngII dans les VSMC. Tel que présenté, l'activation d'AT1 mène à la production massive de ROS, l'activation de petites protéines G impliquées dans la migration cellulaire, et l'activation de facteurs de transcription aux rôles pro-inflammatoires variés. L'AngII induit de manière transcriptionnelle dans les VSMC un nombre surprenant des molécules pro-inflammatoires abordées au chapitre 1. Il a été montré que l'expression de TLR4 est augmentée dans les lésions athérosclérotiques chez l'humain [919]. Or, l'AngII induit l'expression de TLR4 dans les VSMC [919], et ce dernier semble en partie être responsable des effets pro-inflammatoires de l'AngII [920]. L'AngII induit également TLR4 dans d'autres types cellulaires [921, 922]. Il a d'ailleurs été montré qu'un bloqueur d'AT1 inhibait l'expression de TLR2 et de TLR4 in vivo [923]. Rappelons que le TLR2 [74] et le TLR4 [924] sont considérablement importants dans le développement de l'athérosclérose dans des modèles murins<sup>27</sup>. Curieusement, il a été montré que le LPS augmentait la liaison de l'AngII à des VSMC en culture [868] et induisait l'expression d'AT1 in vivo [925]. De plus, l'inhibition d'AT1 entraîne une diminution des effets délétères du LPS dans nombre de modèles [925-927]. Il semble donc que des mécanismes de régulation croisée entre AT1 et les PRRs existent, ce qui incrimine peut-être l'AngII à des rôles initiateurs de l'inflammation. Tel que mentionné plus haut, l'AngII module l'ingestion et l'oxydation des lipides. Dans les VSMC, l'AngII induit l'expression de LOX-1 [928] ainsi que d'autres molécules liées à la prise de lipide [929]. LOX-1 est impliqué in vivo dans les effets hypertrophiques de l'AngII [930], et participe à ses effets pro-angiogéniques [931]. De plus, l'inhibition d'AT1 diminue l'oxydation des lipides chez l'humain [932]. Cependant, l'AngII semble davantage exercer des effets pro-oxydants (contribuant à la dysfonction endothéliale) que des effets sur le taux de LDL sanguins [933]. Finalement, il a été montré que les lipides oxydés pouvaient agir en synergie avec l'AngII dans les VSMC [934]. Il apparaît donc que les effets pro-inflammatoires de l'AngII impliquent la participation de voies de signalisation multiples.

---

<sup>27</sup> Le polymorphisme Asp299Gly du TLR4 chez l'humain est associé à une certaine protection contre l'athérosclérose [82].

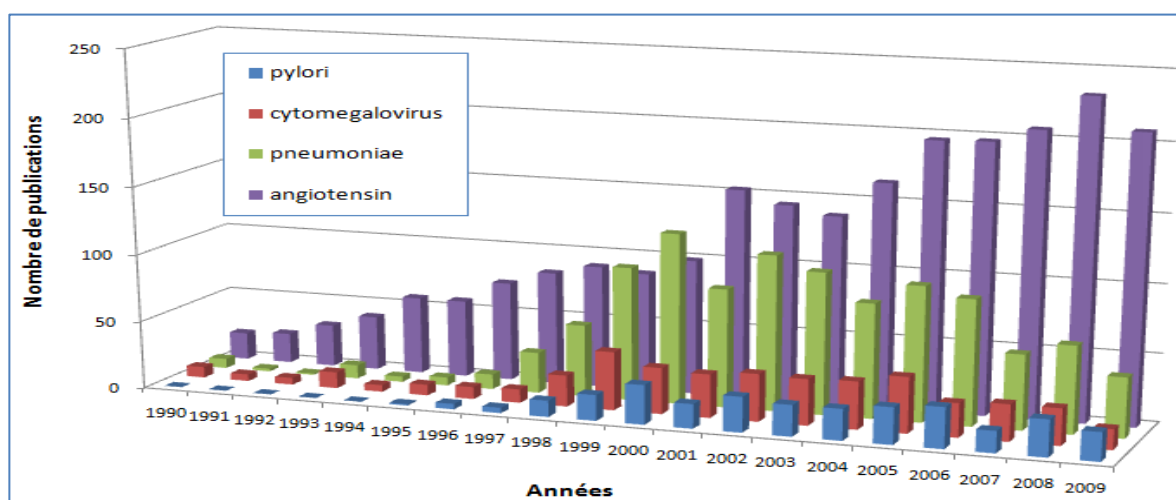


L'AngII induit dans les VSMC l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 [955] et de la chimiokine MCP-1 [956]. L'inhibition de MCP-1 freine d'ailleurs le développement des plaques induites par l'AngII [957]. L'AngII induit également la sécrétion d'IL-6 via l'activation de NF- $\kappa$ B [948, 958]. Finalement, l'AngII est reconnue pour induire l'expression des protéases MMP-2 [959], MMP-1,3 et 9 [706]. Toutes ces évidences nous montrent que l'AngII est un joueur majeur des processus inflammatoires et que ses actions peuvent participer à toutes les étapes du développement de l'athérosclérose.

## **2.4.2 Rôles pro-inflammatoires du cytomégalo virus humain**

### **2.4.2.1 Évidences expérimentales d'un lien entre l'état infectieux et l'athérogenèse.**

Les premières expériences associant un pathogène à l'athérogenèse ont débuté durant les années 70 du siècle dernier. Fabrikant *et alii* ont montré que l'infection de poulets avec un virus de type herpès entraînait l'apparition de plaques athéromateuses, et ce, indépendamment du régime lipidique infligé aux volages [960]. Ces expériences ont été répétées dans un nombre impressionnant de modèles animaux, passant de la souris aux primates (revu dans [961]). Cependant, l'incrimination des pathogènes comme facteurs de risque de l'athérosclérose a véritablement pris son essor à la fin des années 90, ce qui mena d'ailleurs à la mise en branle d'études cliniques chez l'humain (figure 19). Des pathogènes bactériens et viraux, et plus récemment des levures [962-964], ont été étudiés *in vitro* et *in vivo* en vue de déterminer le mécanisme par lequel ces derniers pouvaient exercer des effets pro-inflammatoires. La bactérie intracellulaire obligatoire *C. pneumoniae* a été, de loin, le pathogène le plus associé à l'athérosclérose (figure 19 et revu dans [965, 966]).



**Figure 19 : Histogramme du nombre de publications associant un thème à l'athérosclérose dans Pubmed (1990-2009).**

Nous avons effectué une recherche combinant les dates de publication xxxx[pdat], l'opérateur AND, un pathogène<sup>28</sup> ou *angiotensin*, l'opérateur AND et le mot *atherosclerosis*. Cet histogramme non-exhaustif nous donne une idée de l'importance relative qu'accorde la recherche actuelle à l'étude de facteurs de risques de l'athérosclérose. *C. pneumoniae* est ici le pathogène le plus étudié. Cet engouement pour *C. pneumoniae* à la fin des années 90 a mené à la mise en branle de quelques études cliniques. L'une d'elles, publiée dans le *NEJM* en 2005 a montré que l'antibiotique azythromycine ne modifiait pas le risque d'incidents cardiovasculaires chez les patients atteints de maladies des artères coronaires, mais stables [967]. Une autre étude publiée dans le même exemplaire est parvenue à des conclusions similaires avec un autre antibiotique [968]. Une méta-analyse de plusieurs études cliniques a mené aux mêmes conclusions [969]. Nous pouvons d'ailleurs assister à un certain déclin des publications associant *atherosclerosis* et *pneumoniae* depuis 2005. Le graphique suggère que les pathogènes cytomegalovirus et *H. pylori* sont peu étudiés dans le contexte de l'athérosclérose. D'ailleurs, peu d'études cliniques leur ont été consacrées. Les études concernant le cytomegalovirus visent surtout à établir un lien entre la séropositivité pour ce pathogène et les complications de transplantations diverses (ex : [970]), et à vérifier les effets bénéfiques d'un agent anti-cytomegalovirus tel que le ganciclovir dans ce contexte [971, 972]. En suivant notre procédé de recherche, nous trouvons 458 publications associant *cytomegalovirus* à *transplant* en 2009 (32,4% de l'ensemble des publications sur ce virus en 2009), et près de 2000 publications depuis 5 ans. Une étude clinique intéressante a tout de même montré que l'utilisation de ganciclovir après une transplantation cardiaque diminuait les risques d'athérosclérose de transplantation [973]. La séropositivité au HCMV a d'ailleurs été liée à la dysfonction endothéliale chez l'humain [974].

<sup>28</sup> Nous avons préféré utiliser pneumoniae puisque Chlamydia porte également le nom de Chlamydothyla.

En dépit des nombreux effets pro-inflammatoires de *C. pneumoniae* in vitro, l'utilisation d'antibiotiques variés chez des patients à risque n'a pas montré d'effet protecteur quant à l'apparition des complications de l'athérosclérose [967, 968, 975, 976]. Cependant, une critique pouvant être adressée à ces études est qu'elles ne prenaient pas en considération qu'un l'agent pathogène peut être impliqué dans l'initiation et le développement précoce de l'athérosclérose. Comme nous l'avons illustré dans les sections précédentes et au chapitre 1, la réponse immunitaire innée amorcée par les PRRs induit probablement tout ce qui est nécessaire au développement d'un foyer inflammatoire. De plus, de nombreux pathogènes, dont *C. pneumoniae*, peuvent devenir résistants aux antibiotiques [977], et la biodisponibilité de médicaments tels que l'azithromycine n'a pas été évaluée au sein des plaques athéromateuses (comme il a été fait pour les poumons [978])<sup>29</sup>. Cela dit, un certain raffinement des études cliniques futures permettra probablement d'incriminer ou non *C. pneumoniae*<sup>30</sup>. Parmi les pathogènes suspectés pro-athérogéniques, mentionnons le cytomégalovirus humain (HCMV), l'herpès simplex, *H. pylori* et le virus de l'influenza. Le laboratoire de Marc Servant s'est intéressé au HCMV pour son affinité particulière pour les cellules vasculaires, sa capacité à établir des cycles de latence et de réactivation, et pour ses effets pro-inflammatoires variés et d'induction rapide, ce qui rend ce pathogène susceptible de contribuer autant à l'initiation qu'au développement de l'athérosclérose. Cependant, avant d'aborder plus en détail les particularités de ce virus, nous devons mentionner quelques données cliniques récentes quant à l'implication des pathogènes dans l'athérosclérose. Il a en effet été montré chez l'humain que la séropositivité pour un seul pathogène ne contribuait pas de manière significative au développement de l'athérosclérose. Or, la séropositivité pour plusieurs pathogènes, ce qui est référé sous le terme de *infectious burden* (fardeau infectieux), montre

---

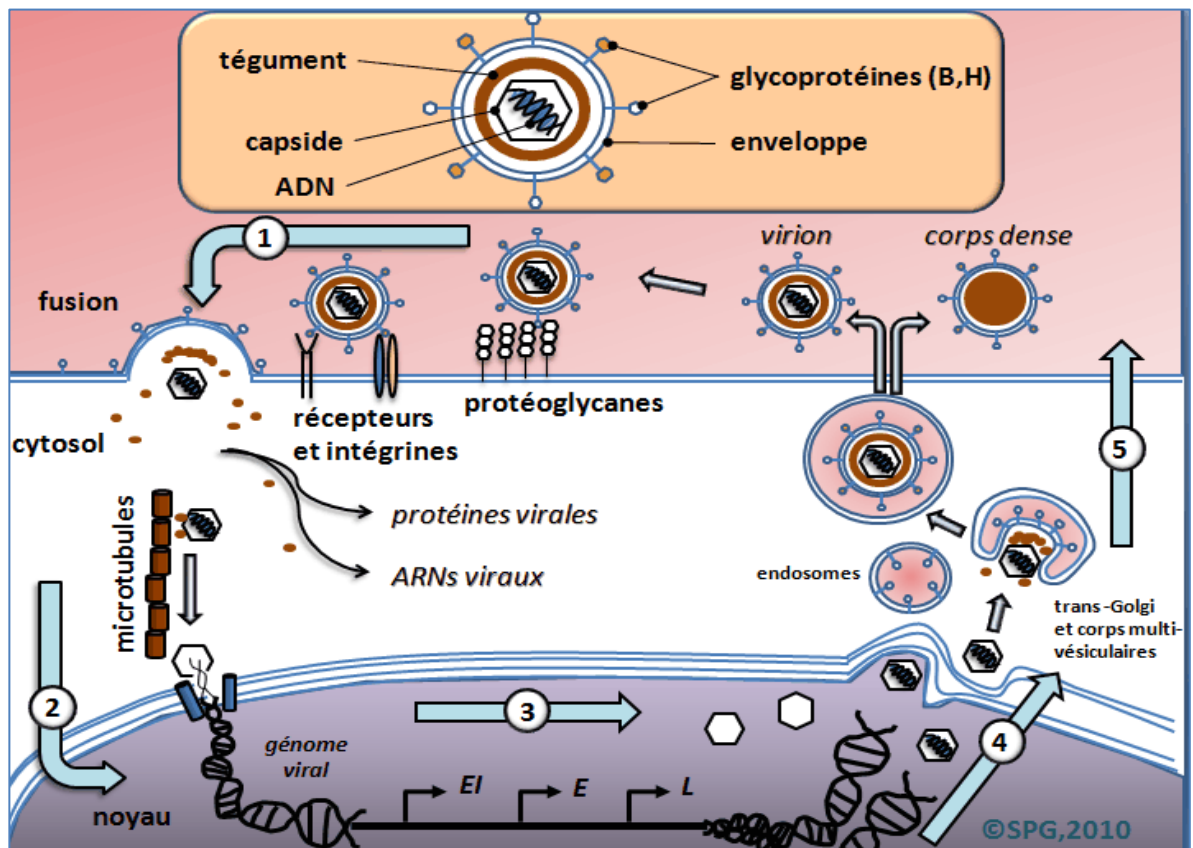
<sup>29</sup> Une étude effectuée chez le rat montre une faible distribution de l'azithromycine dans le cœur [979].

<sup>30</sup> En ce moment-même, quelques études cliniques étudient l'association des pathogènes à l'athérosclérose. Mentionnons les études : *Randomized Evaluation of Short-Term Rifalazil Treatment on Carotid Atherosclerosis and Intima Media Thickness*, en phase II, *Detection of Enterovirus RNA by RT-PCR in Atheromatous Lesions*, qui débute, et *Periodontitis and Its Microbiological Agents as Prognostic Factors in Patients With Coronary Heart Disease*.

clairement un lien proportionnel entre le nombre de pathogènes et les incidences cliniques cardiovasculaires [980-982]. Nous avons introduit à la section 1.5 la notion de para-inflammation, cette inflammation de bas niveau et soutenue qui peut contribuer au développement de maladies pro-inflammatoires variées, dont l'athérosclérose. Ainsi, des infections latentes et réactivées, la présence d'anticorps contre des pathogènes et des marqueurs sériques de l'inflammation pourraient tous contribuer au développement de l'athérosclérose, en potentialiser les risques, sans nécessairement prendre part à l'initiation de la pathologie.

#### **2.4.2.2 La biologie du HCMV**

Le HCMV est un virus à ADN double-brin (ADNdb) de la sous-famille des *β-herpesviridae* (il est également appelé virus de l'herpès 5). Sa forme infectieuse est un virion extrêmement complexe que nous avons schématisé et grandement simplifié à la figure 20. Il intègre au moins 71 protéines virales [983], 70 protéines de l'hôte [984-986] et des ARNs provenant à la fois du virus et de l'hôte [987, 988]. À la surface de son enveloppe bi-lipidique sont exprimées plusieurs glycoprotéines dont la majorité n'est pas caractérisée [989]. La glycoprotéine B (gB) virale a des propriétés immunostimulantes [990, 991] et peut également lier des récepteurs cellulaires [992], comme nous le verrons. Entre la capside icosaédrique qui contient le génome viral et la bicouche lipidique externe se retrouve une couche nommée tégument, ou couche tégumentaire, qui contient notamment des protéines virales qui exercent des rôles multiples dans la cellule hôte, tels que la suppression de l'immunité innée et la réponse interféron.



**Figure 20 : Schéma de la structure du virion et des principales étapes du cycle de réplication du HCMV.**

Voir le texte pour les informations associées.

La recherche des 10 dernières années a permis d'élucider en partie les mécanismes par lesquels le HCMV peut infecter une cellule humaine. Il semble que certains récepteurs particuliers soient nécessaires à sa fusion avec la membrane plasmique cellulaire. Le virus entre d'abord en interaction avec le glycocalyx cellulaire en établissant des liaisons de basse affinité (figure 20) [993, 994]. Puis, le virus établit un contact plus solide en s'associant à une ou plusieurs molécules d'adhésion (ex : intégrines [995, 996]) ou

récepteurs (ex : l'EGFR<sup>31</sup> [998]), ce qui mène à sa fusion. Les gB et gH sont impliquées dans ces processus [999, 1000]. Suite à la fusion du virus à la membrane plasmique, la capside du HCMV se déplace dans le cytoplasme grâce aux réseaux microtubulaires [1001], puis elle relâche le génome viral dans le noyau eucaryote grâce à des séquences de localisation nucléaire présentes à sa surface [1002]. Le génome du HCMV est composé d'un seul duplex d'ADN (ADNdb) linéaire de 235 646 pb qui peut encoder pour au moins 165 protéines et 2 ARNs structuraux (tel que répertoriés sur Pubmed Genome). Les gènes du HCMV sont décrits traditionnellement selon leur cinétique d'expression (phases) : les gènes d'induction rapide sont les gènes  $\alpha$  ou *Immediate-Early* (IE), suivi des gènes  $\beta$  ou *Delayed-Early* ou *Early* (E), puis des gènes tardifs  $\gamma$  ou *Late* (L)<sup>32</sup> [1003]. Les gènes du HCMV ont fréquemment plus d'une seule fonction. Les deux gènes IE principaux, IE1 (IE-72) et IE2 (IE-86), par exemple, participent à la réplication virale [1004], modifient la structure nucléaire [1005] et modulent l'expression des gènes [1006] et la réponse immunitaire de l'hôte [1007]. Le HCMV est un pathogène opportuniste qui utilise les ressources de son hôte eucaryote pour se répliquer. De plus, il modifie considérablement certaines structures cellulaires telles que le noyau pour faciliter la fabrication des capsides des futurs virions<sup>33</sup>. Suite à l'encapsidation de leur matériel génétique, les néo-virions sont formés et libérés suivant une maturation complexe impliquant le réseau trans-Golgi, des corps multi-vésiculaires et des endosomes [1009]. Notons que des PRRs et des molécules de l'immunité associées sont présentes au sein de ces organelles (section 6.1.2). *In vitro*, une quantité variable de virions sans contenu génétique sont formés, nous les appelons corps denses (*dense bodies*) [983].

La capacité du HCMV à infecter une cellule dépend de nombreux facteurs. Un déterminant majeur est l'expression membranaire de molécules ou de récepteurs importants

---

<sup>31</sup> Une certaine controverse existe à ce sujet [997]. L'EGFR ne serait pas nécessaire à l'entrée du virus et ceci est peut-être un effet dépendant du type cellulaire étudié (ceci est abordé à la section 6.1.1).

<sup>32</sup> Cette nomenclature est cependant désuète puisque des gènes L peuvent être IE selon le contexte cellulaire.

<sup>33</sup> Le nom du virus provient d'ailleurs de la formation d'inclusions cytomégaloïques formées dans certains types cellulaires infectés [1008]. Nous regroupons ces modifications cellulaires sous le terme d'effets cytopathiques (CPE, *cytopathic effects*).



à sa fusion, tel que vu précédemment. La capacité du virus à effectuer avec succès une translocation nucléaire de son ADNdb génomique est également un facteur de variabilité [1010]. Un dernier déterminant critique est l'existence d'un état favorable à la réplication du génome viral. En effet, le HCMV peut parvenir à exprimer certaines protéines, sans toutefois disposer des composantes nécessaires à sa réplication. Les cellules dans lesquelles le HCMV se réplique et génère des virions sont « permissives ». Les cellules embryonnaires HEK 293 sont des cellules dites non-permissives<sup>34</sup> [1012]. De manière générale, nous parlerons de tropisme quant à la capacité du virus à infecter une cellule, bien que ce terme soit parfois utilisé pour désigner sa capacité répllicative.

#### 2.4.2.3 HCMV et athérosclérose et chez l'humain

Nous ne discuterons pas dans cette introduction des nombreuses expériences sur le CMV réalisées *in vivo* dans différents modèles animaux d'athérosclérose. Bien qu'intéressants, les résultats issus de ces expériences doivent être interprétés avec précaution, puisque l'ampleur et la cinétique de l'athérogenèse chez les animaux ne sont pas nécessairement représentatives de celles observées chez l'humain [1013]. De plus, le CMV associé à chaque espèce a évolué d'une manière qui lui est propre, et il existe peu d'homologie entre les différents types de CMV<sup>35</sup>. Le modèle murin est grandement prisé dans le domaine de l'immunité innée et de l'inflammation. Cependant, il existe des différences notables entre la biologie du CMV murin (MCMV, *mouse cytomegalovirus*) et celle du HCMV [1016]. Ces informations peuvent tout de même être d'une valeur inestimable quant à la compréhension des mécanismes inflammatoires liant l'infection virale et l'athérosclérose, et nous référons le lecteur à des articles choisis et éclairants quant à l'infection de souris avec le MCMV [1017-1019].

---

<sup>34</sup> Nous pouvons détecter l'induction de certains gènes viraux dans ces cellules, sans toutefois assister à la formation de néo-virions [1011].

<sup>35</sup> Les CMV les plus semblables aux isolats de l'homme sont en ordre de similitude le CMV du chimpanzé, une espèce protégée, suivi du CHV des macaques rhésus [1014]. Une phylogénie des CMV des grands singes a récemment été effectuée [1015].

Il est reconnu que la majorité de la population adulte est séropositive pour le HCMV [1020]. Ce virus est transmissible par tous les fluides corporels et est particulièrement transmis en bas âge, pour cause de promiscuité manifeste. L'infection primaire au HCMV peut occasionner quelques symptômes, mais le virus entrera par la suite en latence suivant son intégration génomique, et ce, pour le restant de la vie de l'hôte. Il pourra occasionnellement être réactivé lors de certains états de stress ou d'immunosuppression. Le HCMV cause de sérieux problèmes dans au moins trois situations médicales bien documentées. La première est l'immunosuppression induite par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), où le HCMV, habituellement inoffensif, se réactive et peut provoquer des rétinites [1021]. Le HCMV a également été associé à l'ampleur de l'athérosclérose et aux risques d'infarctus chez les patients sidéens [1022]. La seconde est l'inflammation associée à la réactivation du HCMV lors d'une greffe d'organe, qui peut mener à l'athérosclérose de transplantation et même au rejet de la greffe [1023-1025]. La dernière et non la moindre, est l'inflammation induite par le HCMV suite à l'angioplastie, lors du phénomène de resténose [1026], qui présente d'ailleurs beaucoup d'homologie avec l'athérosclérose native [1027].

Il a été montré que les artères humaines peuvent contenir de l'ADNdb du HCMV, qu'elles soient atteintes ou non d'athérosclérose<sup>36</sup> [1029, 1030]. Nous pouvons retrouver des antigènes du HCMV dans plusieurs cellules des plaques athéromateuses, dont les VSMC [1031] et les EC [1032]. Il n'est pas clair à l'heure actuelle si ces cellules peuvent être des sites de latence pour le HCMV [1033], mais les deux types cellulaires sont permissifs pour le HCMV *in vitro* [20, 1034, 1035]. Dans l'optique où la présence accrue du CMV dans les lésions peut être associée au développement précoce des plaques [1032, 1036], une alternative intéressante est l'infection *de novo* de cellules vasculaires par les monocytes recrutés au foyer inflammatoire [1037, 1038].

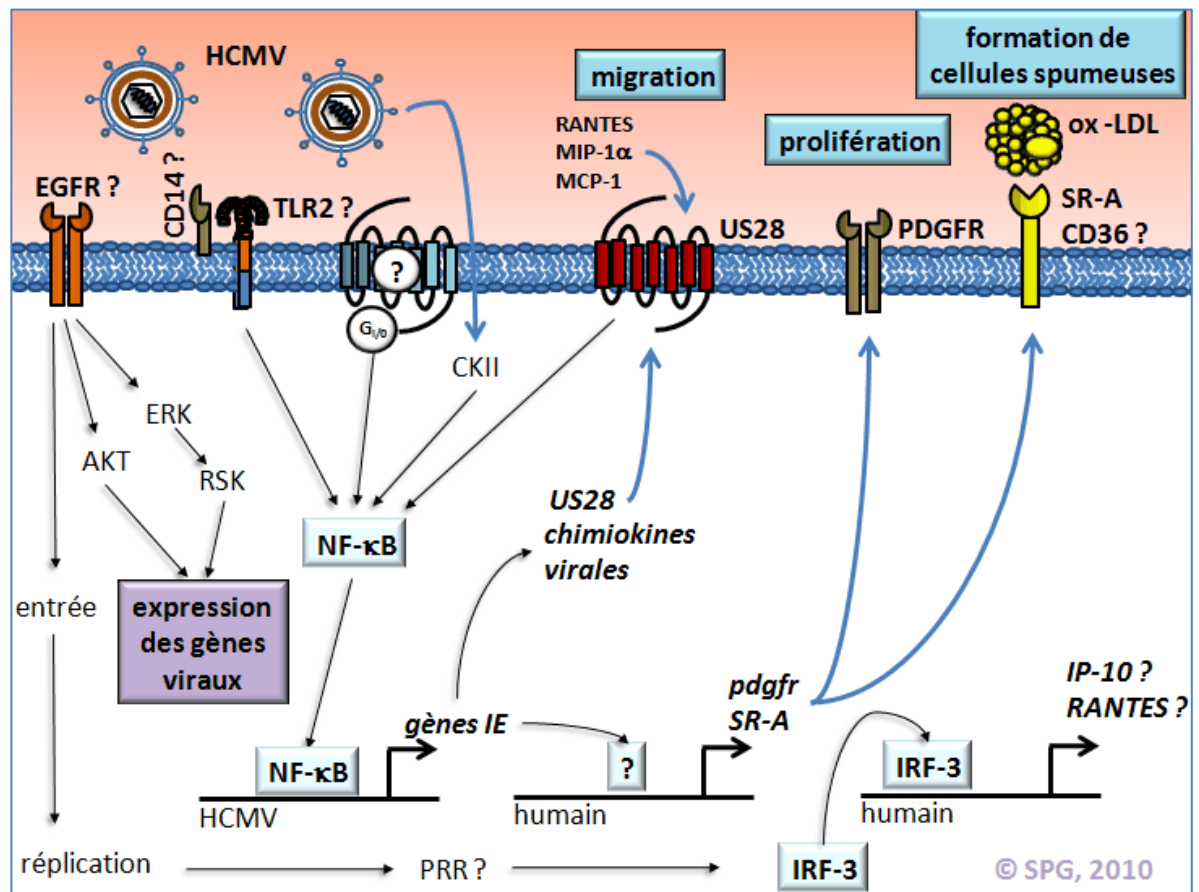
---

<sup>36</sup> Le HCMV est détectable dans un nombre impressionnant de tissus et d'organes chez les sujets sains et séropositifs [1028].

L'évaluation de marqueurs sériques de l'infection au HCMV a permis d'établir un lien important entre ce pathogène et l'athérosclérose chez l'humain. En effet, il a été montré qu'il existe une relation proportionnelle entre la quantité d'anticorps anti-cytomégalo virus et l'épaississement des artères [1039], de même qu'une certaine association avec le risque de maladies cardiovasculaires [1040]. Finalement, le HCMV est l'un des pathogènes associés au fardeau infectieux, tel que discuté précédemment, et il devient davantage étudié dans ce contexte.

#### **2.4.2.4 Mécanismes pro-inflammatoires du HCMV dans les VSMC**

Le HCMV peut infecter de nombreuses cellules vasculaires résidentes (EC, VSMC, fibroblastes) ou recrutées en conditions inflammatoires (NK, M $\phi$ , DC). Il a été montré *in vitro* que les VSMC sont permissives pour le HCMV [1035]. Le HCMV exerce dans ces cellules de nombreux effets pro-inflammatoires analogues à ceux retrouvés dans l'athérosclérose (figure 21). Une infection au HCMV induit l'expression du PDGFR, ce qui promouvoit la migration et la prolifération des VSMC [1041]. Le HCMV module également la reconnaissance et la prise de lipides en induisant l'expression du récepteur *scavenger* SR-A [1042]. Ces études ont suggéré l'implication de gènes IE dans ces induction, ces gènes étant reconnus pour moduler la transcription de gènes viraux et cellulaires (revu dans [1043]). Étonnamment, Fabrikant *et alii*, ceux-là même qui ont établi les premiers liens entre *herpesviridae* et athérosclérose, ont montré que l'infection de cellules en culture induisait la formation de cristaux de cholestérol [1044] (voir section 2.2.2). Bien que ceci n'ait pas été démontré pour le HCMV, ce dernier semble avoir le potentiel d'influencer la formation de cellules spumeuses et d'induire une réponse inflammatoire envers des composés lipidiques.



**Figure 21 : Exemples de voies pro-inflammatoires pouvant être induites par le HCMV dans les VSMC.**

Ce schéma est intentionnellement dépassé, puisqu'il représente l'état des connaissances au moment où nous amorçons nos recherches. Nous avons identifié par des points d'interrogation quelques aspects alors inconnus. Certains de ces aspects sont à la base du raisonnement de nos recherches (section 4.1). Voir le texte pour les détails associés.

Les effets du HCMV ne se limitent pas à ces derniers exemples. Le génome du HCMV encode pour au moins 3 récepteurs à chimiokines et 3 chimiokines (revu dans [1045]). Le HCMV induit notamment l'expression d'US28, un GPCR couplé à  $G_{q/11}$ ,  $G_i$  et  $G_{16}$ . Ce GPCR a la particularité de pouvoir lier de nombreuses chimiokines (figure 21) et a la capacité d'induire la migration des VSMC [1046-1048]. De plus, il est constitutivement actif et induit l'activation de NF- $\kappa$ B [1049] et de la MAPK p38 [1050]. Comme nous

l'avons mentionné précédemment, le HCMV peut être réactivé suite à certains stress (revu dans [1051]). Le promoteur de ses gènes IE contient entre autres des éléments NF- $\kappa$ B et est induit par le TNF [1052]. Or, il a été montré qu'US28 pouvait induire l'expression des gènes IE par des procédés impliquant p38 et NF- $\kappa$ B [1053]. De plus, les rôles multiples d'US28 l'associent désormais au développement du cancer [1054] et à l'angiogenèse [1055].

Une étude a par ailleurs montré que le HCMV induisait rapidement (dans les minutes suivant l'infection) l'activation de NF- $\kappa$ B par une voie sensible à la toxine pertussique [1056], un composé qui entraîne l'ADP-ribosylation et l'inhibition des protéines G<sub>i</sub> [1057]. Or, bien que l'US28 soit couplé à G<sub>i</sub>, son induction ne débute que 2h post-infection [1058]. Actuellement, aucun GPCR n'a été identifié comme récepteur du HCMV essentiel à sa fusion. De plus, l'enveloppe du virion du HCMV ne contient pas d'US28, bien qu'elle contienne d'autres récepteurs à chimiokine (qui ne semblent pas induire NF- $\kappa$ B [983]). Or, il a été montré que la gB du HCMV pouvait lier le TLR2 et induire l'activation de NF- $\kappa$ B [990]. Par ailleurs, il a récemment été montré le HCMV pouvait libérer dans son hôte une caséine kinase qui a la capacité d'induire rapidement l'activation de NF- $\kappa$ B [1059].

Il a été montré que le HCMV pouvait induire l'expression de RANTES dans les fibroblastes [1060]. Tel que mentionné au tableau 3, cette cytokine est sous le contrôle des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF-3 (vus en détail au chapitre 3). Or, le HCMV a la capacité d'induire l'activation d'IRF-3 dans ces cellules [1061]. Lors de nos recherches, la capacité du HCMV à induire IRF-3 dans les VSMC était inconnue, de même que le procédé pouvant mener à son activation. La nécessité du virus à entrer dans la VSMC (via l'EGFR, par exemple) et à amorcer un processus de réplication sont donc tous des mécanismes possibles par lesquels le HCMV peut induire l'activation de la réponse immunitaire innée. Nous abordons dans la discussion de cette thèse quelques récents développements quant à l'élucidation de ces mécanismes (section 6.1.2).

### 3. Les kinases IKK et IKK-related

Nous avons illustré dans le chapitre précédent quelques mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de l'athérosclérose. Le contrôle de facteurs de transcription latents par des kinases spécifiques est un procédé au cœur de tout processus inflammatoire. Nous avons mentionné à plusieurs reprises l'implication du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, et quelquefois d'IRF-3, dans l'inflammation. Nous allons discuter dans cette section des kinases responsables de l'activation de ces facteurs de transcription. Ces kinases forment une famille de 4 membres qui se démarquent l'un de l'autre par leur voies d'activation, qui implique la liaison de partenaires et de molécules d'échafaudage précises, de même que par leur spécificité apparente de substrat.

#### 3.1 Caractéristiques générales

Le génome humain encode pour au moins 518 kinases qui forment le kinome humain, et celles-ci font partie de familles aux caractéristiques conservées [1062]. Les kinases IKK et IKK-related forment une petite branche distincte qui a peu d'homologie avec les autres familles. Quelques protéines peu ou pas caractérisées leur sont vaguement homologues<sup>37</sup>. Les kinases IKK et IKK-related sont des kinases à sérine et thréonine qui possèdent les 3 motifs catalytiques conservés chez les phosphotransférases : les motifs VAIK, HRD et DFG, qui sont nécessaires à la liaison des phosphates  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ATP, à la catalyse, et à la chélation du  $Mg^{2+}$  de l'ATP, respectivement [1062]. Ces motifs sont essentiels à l'activité des kinases. La mutation de la lysine (K) du motif VAIK en alanine (A) ou méthionine (M) rend les kinases inactives (KD, *kinase dead*), et cela correspond par exemple aux substitutions K44M chez les kinases IKK [128], et aux substitutions K38A chez les kinases IKK-related [130, 132].

---

<sup>37</sup> Les kinases SBK1, SBK2 et Sgk110 [1062]. SBK1 est principalement retrouvée au cerveau et est importante dans le développement [1063]. Les kinases IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et TBK1 sont également importantes dans le développement [129, 1064-1066].

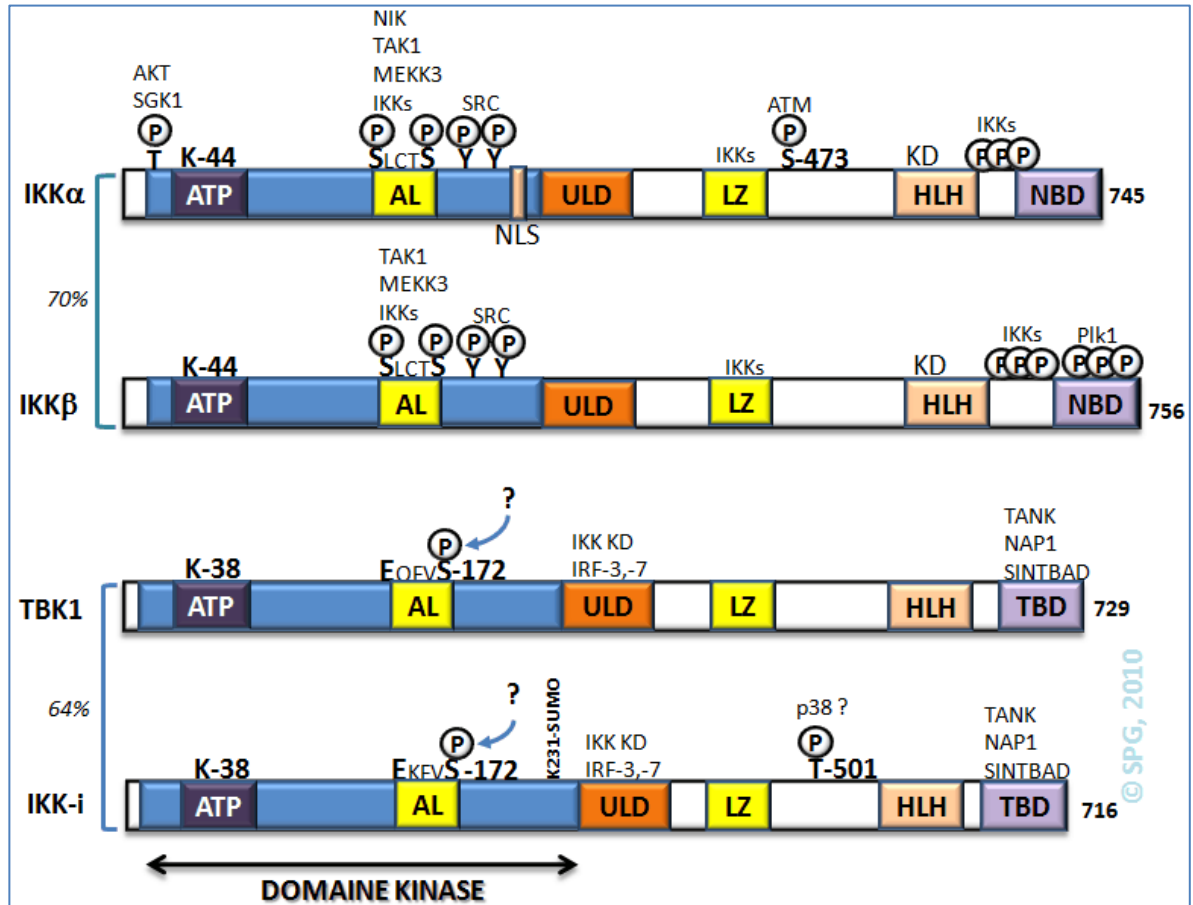
Nous avons illustré à la figure 22 la structure linéaire des 4 kinases à l'étude. IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , les premières découvertes, ont 70% d'homologie et 52% d'identité. Les kinases homologues (*related*) TBK1 et IKK-i ont été identifiées par la suite, et ont 64% d'homologie entre elles. Ces 4 kinases partagent une topologie grandement similaire ainsi qu'une importante homologie au niveau de leur domaine kinase [127]. Ces kinases diffèrent toutefois au niveau de leur régulation, de leurs interactions avec des partenaires et de leur spécificité de substrat. Elles sont régulées par phosphorylation au niveau de sérines situées approximativement au centre de leur domaine kinase conservé (figure 22), et qui constituent la boucle d'activation (*activation loop* ou *T-loop*)<sup>38</sup>.

Les kinases IKK $\alpha$  et  $\beta$  présentent dans cette région 2 sérines (S) de motif SxxxS (où x représente n'importe quel acide aminé) qui peuvent être phosphorylées par quelques MAP3K (MAPKKK, MEKK) dont NIK [1068, 1069], TAK1 [1070, 1071] et MEKK3 [1072-1074]. Au contraire, les kinases TBK1 et IKK-i ne présentent pas ce motif, et aucune des kinases qui pourraient les phosphoryler directement n'a été identifiée à ce jour (bien que certaines évidences expérimentales en suggèrent l'existence [1075]). Par ailleurs, ces kinases auraient la capacité de s'autophosphoryler au niveau de la boucle d'activation, notamment en condition d'expression ectopique [127, 128, 1075].

Le modèle actuel d'activation des kinases IKK actuel est le suivant (figure 23). Les kinases IKK et IKK-related possèdent des motifs hélice-boucle-hélice (HLH) à leur extrémité C-terminale, ainsi que des motifs fermeture éclair à leucine (LZ, *leucine zipper*). Il a été montré que les kinases IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  peuvent former des homodimères ou des hétérodimères grâce à leurs motifs LZ (revu dans [127]), mais ceci n'est pas clair en ce qui concerne les kinases IKK-related [1076].

---

<sup>38</sup> La boucle d'activation est une petite séquence d'acides aminés qui est repliée dans le site catalytique de la kinase et qui bloque ainsi son activité. Cette boucle est déplacée par des modifications post-traductionnelles ou suite à la liaison de partenaires (ex : les cyclines et les CDK [1067]).



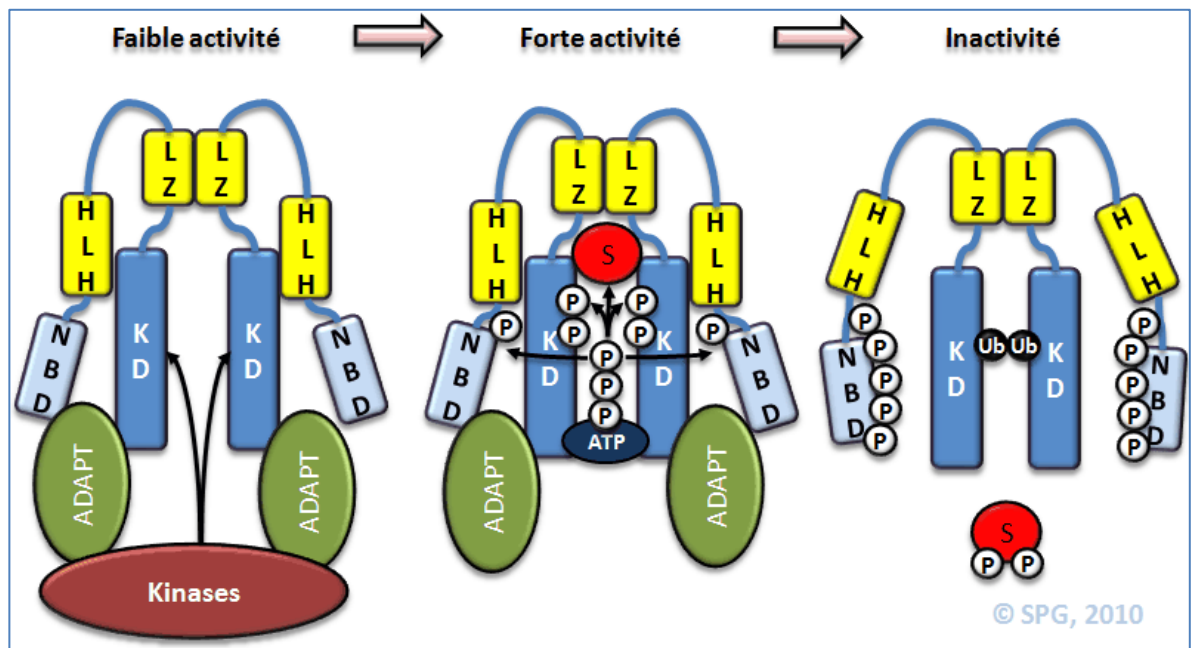
**Figure 22 : Domaines, modifications post-traductionnelles et partenaires des kinases IKK et IKK-related.**

Les détails se retrouvent dans le texte de cette section. Abréviations : ATP : domaine de liaison à l'ATP; AL : *Activation loop*; LZ : *Leucine zipper*; HLH : *helix-loop-helix*; NBD : *Nemo-binding domain*; TBD : *Tank-binding domain*; P : phosphate; KD : Liaison au domaine kinase; NLS : *Nuclear localization signal* ; ULD : *ubiquitin-like domain*.

Les motifs HLH quant à eux sont repliés à proximité du domaine catalytique des kinases. Suite à l'activation des kinases, celles-ci s'autophosphorylent (ou se transphosphorylent [127]) au niveau de la boucle d'activation [1077] ainsi qu'au niveau de leur queue C-terminale. Cette dernière modification entraînerait progressivement leur inhibition [1078]. Sous certaines conditions, la monoubiquitination d'une K à proximité de la boucle d'activation de IKK $\beta$  par la E3 ligase Ro52 [1079] serait un prérequis à la



l'autophosphorylation inhibitrice de IKK $\beta$  en C-terminal [1080]. Le contexte d'ubiquitination est identique chez IKK $\alpha$ , et est grandement homologue chez les kinases IKK-related (observations personnelles). Ceci laisse présager que ce mécanisme d'auto-inhibition est commun à toutes ces kinases.



**Figure 23 : Modèle d'activation des kinases IKK.**

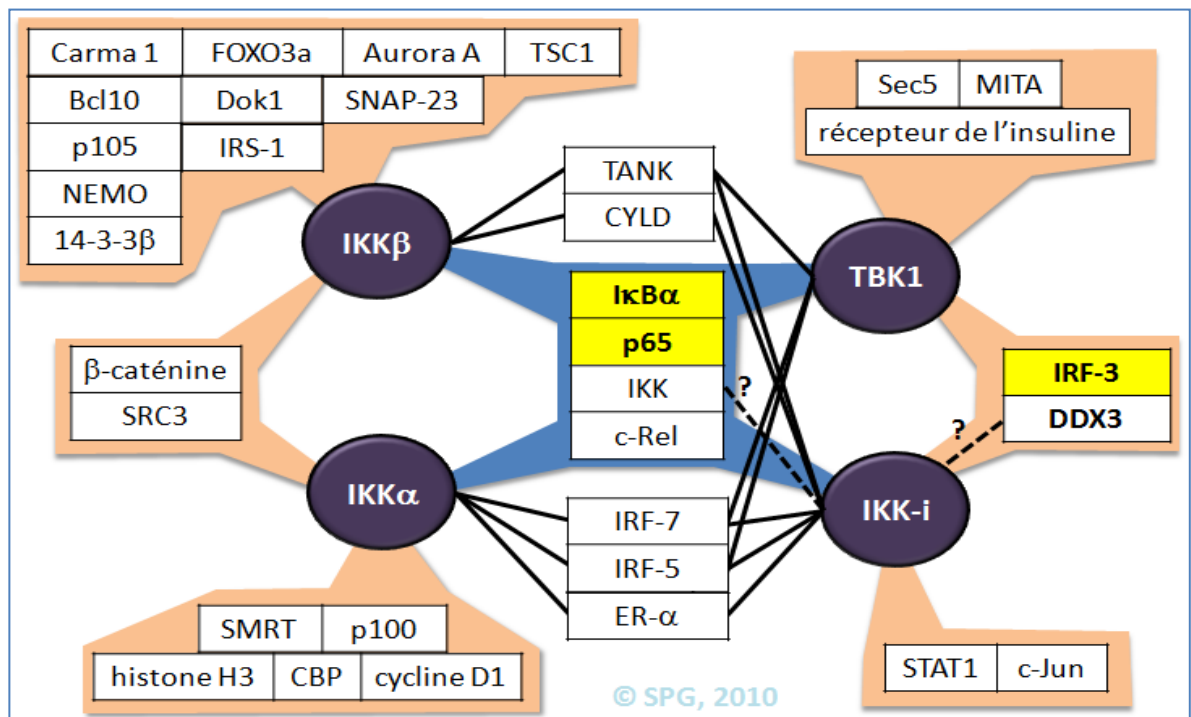
Ce modèle est issu d'informations concernant les kinases IKK $\alpha/\beta$  [127, 1077, 1079, 1081]. Nous suggérons la possibilité d'un mécanisme semblable chez les kinases IKK-related, puisqu'elles partagent avec les kinases IKK $\alpha/\beta$  une topologie grandement similaire. L'ubiquitination présentée est celle effectuée par Ro52 (voir texte). Un domaine semblable à l'ubiquitine (ULD, *ubiquitin-like domain*) a été identifié dans les 4 kinases (figure 22). Chez les kinases IKK-related, ce domaine serait impliqué dans des interactions protéiques variées (substrats et kinases) [1082]. Il serait également important pour l'activité d'IKK $\beta$  [1083]. Nous avons positionné le substrat au niveau de ce domaine. (Abréviations utilisées : ADAPT : adaptateur (NEMO pour les kinases IKK, TANK, NAP1 et SINTBAD pour les kinases IKK-related); P : phosphate; Ub : monoubiquitination; KD : kinase domain; LZ : leucine zipper; HLH : Helix-loop-helix; NBD : NEMO-binding domain; S : substrat.

Un fait notable, tel qu'illustré aux figures 22 et 23, est que l'extrémité C-terminale des 4 kinases contient des éléments de liaison à des protéines adaptatrices essentielles à leur activation. Il a d'ailleurs été suggéré que la phosphorylation de ces éléments par d'autres kinases pouvait inhiber les IKK [1081]. Il existe d'autres mécanismes d'inhibition des kinases IKK et IKK-related. Nous avons vu que ces kinases sont modulées par phosphorylation. Or, différentes protéines phosphatases (PP) étaient impliquées dans la déphosphorylation inhibitrice de ces kinases. Les kinases  $IKK\alpha/\beta$  peuvent être déphosphorylées par PP2A [1084], PP2C $\beta$  [1085] et PP1 [1086]. Il semble que TBK1 puisse être déphosphorylée par SHIP-1 [1087]. Les IKK-related kinases sont également modulées par un autre procédé. En effet, ces kinases sont poly-ubiquitinées en K63, et cette modification post-traductionnelle est importante dans leur activité. La désubiquinase A20 est recrutée aux kinases IKK-related grâce à la protéine TAX1BP1, ce qui les inhibe [1088]. Par ailleurs,  $IKK\beta$  peut être dégradée suivant son ubiquitination par KEAP1 [1089]. D'autres kinases sont impliquées dans la modulation de ces kinases. La kinase à tyrosine SRC phosphoryle des résidus à proximité de la boucle d'activation des  $IKK\alpha/\beta$  [1090] et est importante dans l'activation de ces kinases [1091-1093]. D'autres kinases telles que AKT [1094], SGK1 [1095], Plk1 [1081], PDK1 [1096], ATM [1097] et p38 [1098] sont suspectées de réguler d'une manière ou d'une autre les kinases IKK ou IKK-related par phosphorylation directe.

Les kinases  $IKK\alpha/\beta$  et TBK1 sont exprimées dans tous les tissus. IKK-i est le plus souvent très faiblement exprimée, mais induite en conditions inflammatoires, « i » signifiant inductible [132]. Cette dernière est particulièrement exprimée de manière constitutive dans les leucocytes, notamment dans les macrophages [1099]. Ces kinases sont le plus souvent détectées dans le cytoplasme par microscopie à fluorescence [1100].  $IKK\alpha$ , quant à elle, contient un NLS [1101]. Elle a la particularité de s'accumuler au noyau cellulaire et d'y réguler de manière importante et variée la transcription des gènes [1102-1104]. De récentes évidences montrent qu'IKK-i peut également s'accumuler au noyau et y subir une SUMOylation [1105]. Finalement, la kinase IKK-i a la capacité d'être recrutée

à la surface des mitochondries [1106], tandis que TBK1 s'accumulerait au niveau de vésicules périnucléaires [1107]. En somme, nous constatons après ce bref survol que les kinases IKK et IKK-related ont, en dépit de leurs similitudes, d'étonnantes différences qui seront approfondies dans les prochaines sections.

Les kinases IKK et IKK-related ont un éventail de substrats grandissant (figure 24). Bien que certains rares substrats soient être partagés entre elles, il semble que ces kinases possèdent leur propre spécificité de substrat, ce qui les implique dans des réponses cellulaires bien précises. La phosphorylation directe de substrats par les kinases n'est pas toujours prouvée, puisque nombre de phosphorylations ne sont observées qu'en surexpression des kinases (un bon exemple est IRF-5 [1108, 1109]). De plus, la phosphorylation *in vitro* n'est pas nécessairement représentative de la phosphorylation *in vivo*, tel que montré pour IKK $\alpha/\beta$  et c-Rel [1110]. Par ailleurs, les kinases TBK1 et IKK-i recombinantes ont une faible spécificité de substrat *in vitro* (Gravel SP et Servant MJ, résultats non-publiés). Ainsi, plusieurs substrats présentés à la figure 24 n'y figurent peut-être qu'à titre provisoire. Il nous apparait évident que la localisation différentielle des kinases dans la cellule et la liaison spécifique de molécules adaptatrices représentent les véritables facteurs déterminant la spécificité de substrat *in vivo*. Nous allons nous intéresser à 3 substrats en particulier dans les sections suivantes : IkB $\alpha$ , p65/RelA et IRF-3, les 2 derniers étant des facteurs de transcription essentiels à la réponse immunitaire innée.



**Figure 24 : Substrats partagés et spécifiques des kinases IKK et IKK-related.**

4 substrats de la voie NF- $\kappa$ B semblent communs aux 4 kinases (bleu, au centre), bien que ceci soit parfois observé *in vitro* ou en surexpression seulement [128, 130, 132, 1110-1112], ce qui laisse présager un rôle indirect. Il est généralement admis qu'IKK $\beta$  est la kinase principale d'I $\kappa$ B $\alpha$  *in vivo* [1113]. Les 4 kinases semblent pouvoir phosphoryler directement p65 [1114, 1115]. Les kinases IKK $\alpha$ / $\beta$  ont de nombreux substrats qui les impliquent dans le contrôle de la transcription (histone H3 [1104], CBP [1116], SMRT [1117], SRC3 [1118, 1119]) et le contrôle du cycle cellulaire (Aurora A [1120], cycline D1 [1121]). La phosphorylation de certains substrats par les IKK a parfois des effets contraires. Par exemple, alors que IKK $\beta$  active p65 [1114] et inhibe  $\beta$ -caténine [1122], il semble que IKK $\alpha$  inhibe p65 [1123] et active  $\beta$ -caténine [1124]. Le résidu phosphorylé sur un même substrat semble également parfois différer, tels que pour I $\kappa$ B $\alpha$  lorsque ciblé par les kinases IKK-related [130, 132]. Les kinases IKK-related sont des régulatrices majeures de la production d'IFNs. Elles phosphorylent à cet effet directement IRF-3 et -7 [1125]. De récentes évidences montrent l'importance d'IKK $\alpha$  dans la régulation des IRFs [1108, 1126]. (?) : Lien manquant. En effet, il n'a pas été montré qu'IKK-i pouvait agir à titre d'IKK-kinase. De plus, IKK-i interagit avec DDX3 [1127], une hélicase multifonctionnelle, mais la phosphorylation de cette dernière n'a été montrée que pour TBK1 [1128]. Pour plus d'informations concernant les différents substrats, nous référons le lecteur aux revues suivantes [1129, 1130] et aux articles suivants [1127, 1128, 1131-1136].

## 3.2 L'activation de NF- $\kappa$ B

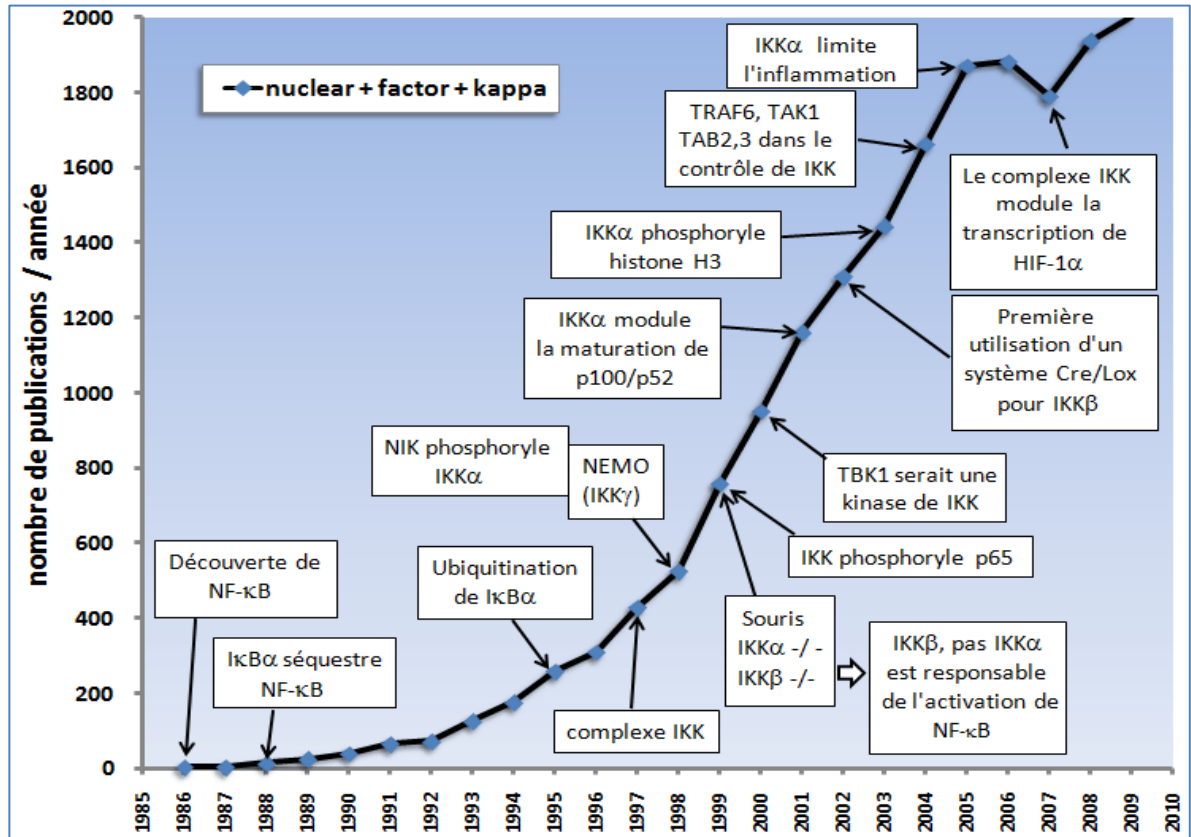
### 3.2.1 Fondements de l'activation de NF- $\kappa$ B

La caractérisation initiale du facteur de transcription NF- $\kappa$ B a été réalisée dans les années 1980 par les équipes de David Baltimore<sup>39</sup> [1137] et de Robert Perry [1138] (figure 25). Ce facteur de transcription nucléaire et inductible par les esters de phorbol avait la propriété d'induire l'expression de la chaîne  $\kappa$  des immunoglobulines dans les cellules B (d'où son nom). Il se liait à des éléments 5'-GGGACTTC-3' (éléments de réponse  $\kappa$ B) sur l'ADNdb. Il a été rapidement observé qu'il était séquestré dans le cytoplasme [1139, 1140] et lié à un inhibiteur instable, I $\kappa$ B [1141]. NF- $\kappa$ B se présente alors comme un hétérodimère composé d'au moins 2 sous-unités, l'une de 50 kDa, l'autre de 65 kDa, qui correspondent respectivement à p50 et à p65/RelA, cette dernière étant responsable de la liaison à l'inhibiteur [1141]. Il a ensuite été montré qu'il pouvait être induit par le TNF [1142], l'IL-1 [1143] et l'ARNdb [1144], et qu'il pouvait induire l'expression des interférons (IFNs) [1145]. NF- $\kappa$ B induit l'expression du HIV [1146], puis l'équipe d'Edward Mocarski montre que le promoteur des gènes IE du HCMV est modulé par NF- $\kappa$ B [1147]. NF- $\kappa$ B se présente donc initialement comme un régulateur majeur de la réponse immunitaire.

Le mécanisme de régulation de NF- $\kappa$ B est éclairci lorsqu'il est montré que la phosphorylation d'I $\kappa$ B est inductible [1148]. Suivant sa phosphorylation, ce dernier se détache de NF- $\kappa$ B, ce qui révèle sur ce dernier un signal de localisation nucléaire [1149], puis I $\kappa$ B $\alpha$  est assujetti parallèlement à une dégradation massive [1150, 1151]. Sous certaines conditions, il a été montré que NF- $\kappa$ B a la capacité d'induire l'expression de nombreux gènes dont celui de son propre inhibiteur, ce qui suggère que son activation est transitoire et finement contrôlée [1152].

---

<sup>39</sup> Prix Nobel de physiologie ou médecine (1975), partagé avec Renato Dulbecco et Howard Martin Temin pour leur étude de la transcriptase inverse.



**Figure 25 : Survol des découvertes charnières dans les domaines d'étude de NF-kappaB.**

Ce graphique met en relief l'importance qu'accorde la recherche actuelle à l'étude de la voie NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription polyvalent. Les détails se retrouvent dans le texte de ce chapitre. Pour générer ce graphique, nous avons effectué une recherche dans Pubmed tel que décrit à la figure 19.

Il apparaît par la suite que p65 est une phosphoprotéine et que sa phosphorylation influence son activité transcriptionnelle [1153]. La recherche de kinases potentielles d'I $\kappa$ B $\alpha$  et de p65 débute alors. La caséine kinase II (CKII) phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$  de manière constitutive en C-terminal [1154]. Tel que montré par Rongtuan Lin et John Hiscott, CKII phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$  dans son domaine PEST (figure 26) [1155]. Cette modification est responsable de la dégradation basale d'I $\kappa$ B $\alpha$  seulement, et n'explique pas la dégradation massive observée suite à différents traitements. Ce sont les phosphorylations inductibles au

niveau des sérines 32 et 36 en N-terminal qui sont responsables de sa dégradation [1156, 1157], et ces phosphorylations sont préalables à son ubiquitination et à sa dégradation via le protéasome [1158, 1159]. Une version mutante d'I $\kappa$ B $\alpha$ , où ces 2 sérines sont substituées pour des alanines, devient un « super-répresseur » de la voie NF- $\kappa$ B lorsque surexprimée, ce qui est particulièrement utile pour valider l'implication de cette voie dans l'induction de certains gènes [1160]. L'équipe de David Wallach montre ensuite que la kinase NIK (NF- $\kappa$ B *inducing kinase*), une MAP3K liée à TRAF2, était importante dans l'activation de NF- $\kappa$ B par le TNF et l'IL-1 [1161]. Une étude des partenaires de TRAF2 menée par Mike Rothe a permis d'identifier une première kinase inductible d'I $\kappa$ B $\alpha$ , CHUK (IKK1/IKK $\alpha$ ), qui s'est avérée être la véritable cible de NIK [1068, 1162]. MEKK1 peut également cibler IKK $\alpha$  [1163].

Les premières observations attestant l'existence d'un complexe multiprotéique (700 kDa) responsable de la phosphorylation inductible d'I $\kappa$ B $\alpha$  ont été faites par Tom Maniatis qui, suprenamment, montra que l'activité de ce complexe dépendait d'une activité ubiquitine ligase [1164]. Les composantes à activité kinase de ce complexe ont été découvertes en 1997 par 2 groupes indépendants menés par Michael Karin [1165] et par Frank Mercurio [128]. Les composantes essentielles de ce complexe avaient 87kDa (IKK $\beta$ ) et 85kDa (IKK $\alpha$ /CHUK). La protéine adaptatrice essentielle du complexe IKK, NEMO/IKK $\gamma$ , fut identifiée l'année suivante par Michael Karin [1166] et Alain Israël [1167]. Grâce à la génération de souris KO pour IKK $\alpha$  ou IKK $\beta$ , Michael Karin effectuera un tour de force en parvenant à différencier les rôles spécifiques de ces deux kinases, une étude de longue haleine qui ne cessera de nous surprendre [1113, 1123, 1168]. Il exercera par le fait même une influence majeure dans les domaines de l'inflammation et du cancer. Le rôle spécifique de ces kinases a notamment été étudié dans différents contextes grâce à la création de souris avec délétions tissu-spécifiques (système cre-lox)<sup>40</sup> [1169].

---

<sup>40</sup> Michael Karin et Klaus Rajewsky ont établi un système conditionnel pour IKK $\beta$  en 1999 (communication personnelle de M. Karin en date du 1<sup>er</sup> août 2010).

### 3.2.2 Les familles NF- $\kappa$ B et I $\kappa$ B

Ainsi, en très peu d'années, les principaux acteurs impliqués dans l'activation de NF- $\kappa$ B ont été identifiés, ce qui en fait probablement la voie de signalisation la plus étudiée étant donné son importance pathophysiologique (figure 25). Nous présentons les principaux membres de la famille NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B à la figure 26, et illustrons leurs domaines et principales modifications post-traductionnelles. Tous les membres de la famille NF- $\kappa$ B possèdent à l'extrémité N-terminale un domaine d'homologie à Rel<sup>41</sup>, nommé RHD (*Rel homology domain*) [1171, 1172]. Ce domaine est responsable de la dimérisation des sous-unités, leur translocation nucléaire, la liaison aux inhibiteurs d'I $\kappa$ B ainsi qu'à la liaison à l'ADN [1173]. Pour lier l'ADN, les sous-unités de NF- $\kappa$ B doivent obligatoirement former des dimères ou hétérodimères [1174]. Seul RelB n'a pas la capacité de former des homodimères, mais il peut dimériser avec p52 ou p50<sup>42</sup> [1177]. Nous résumons à la figure 27 les différentes possibilités de dimérisation de ces sous-unités.

Les différents dimères se distinguent l'un de l'autre par leur profil d'expression spécifique [1178, 1179], leurs voies d'activation, leur liaison préférentielle à des éléments  $\kappa$ B [1174, 1180] ainsi que par le profil de gènes qu'ils induisent [1181]. Les dimères les plus communs sont p65:p50, p65:p65 et p50:p50. Les autres dimères se retrouvent en quantité négligeable ou sont spécifiquement importants dans des cellules telles que les lymphocytes B [1182] ou les DC [1183, 1184]. Le domaine de transactivation (TD) présent chez p65, c-Rel et RelB recrute des co-activateurs (CBP/p300) [1185-1187]. Le TD étant absent de p52 et p50, ceux-ci doivent former des hétérodimères avec l'un ou l'autre des membres comprenant un TD pour recruter CBP [1188]. Par ailleurs, leurs homodimères sont répresseurs [1189]. p65 interagit avec CBP, un procédé qui semble impliquer sa phosphorylation sur la sérine 276 [1190].

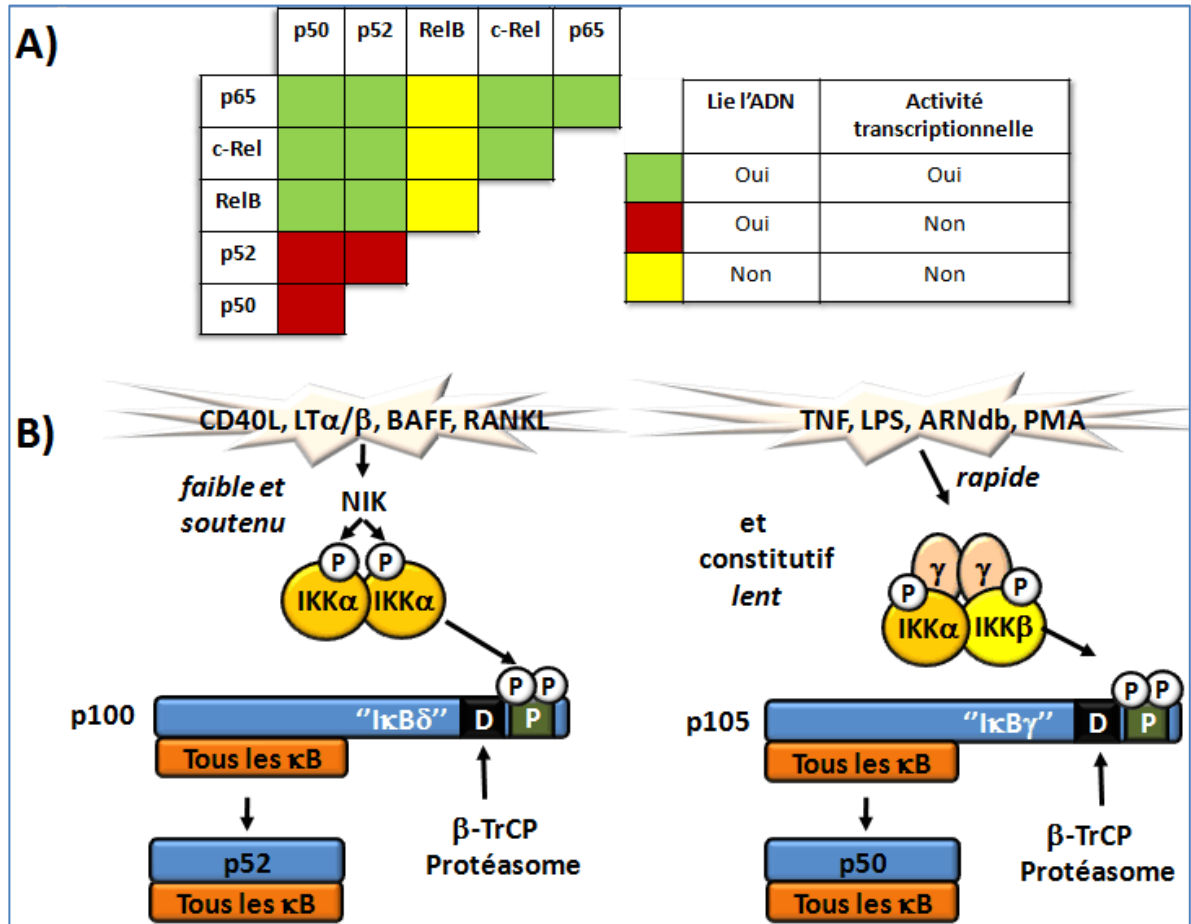
---

<sup>41</sup> Le premier homologue identifié est c-Rel, en 1983. Il possédait une grande homologie avec l'oncogène v-Rel du rétrovirus aviaire de la réticulo-endothéliose [1170]. En 1990, il a été montré que v-Rel était un répresseur de la voie NF- $\kappa$ B [1171].

<sup>42</sup> L'hétérodimère RelB:p65 n'a pas la capacité de lier l'ADN [1175]. Il est tout de même suggéré que RelB a la capacité de former un homodimère instable de manière transitoire [1176].







**Figure 27 : Combinaisons possibles des sous-unités de NF-kappaB et maturation des précurseurs p100 et p105.**

**A)** Sur 15 dimères possibles, 9 sont potentiellement activateurs, 3 sont répresseurs et 3 sont instables [1201]. **B) À gauche**, la voie alternative (non-canonique) d'activation de NF- $\kappa$ B, importante notamment lors du développement, la prolifération et la maturation des lymphocytes B [1202]. La kinase NIK était connue pour être importante dans la maturation de p100 en p52 [1203]. Bien qu'elle puisse phosphoryler *in vitro* p100, sa véritable cible est IKK $\alpha$ , qui se charge spécifiquement de la phosphorylation de p100 en C-terminal au niveau du domaine PEST [1168]. p100 est reconnu par  $\beta$ -TrCP et dégradé via le protéasome [1204, 1205], ce qui libère des dimères variés impliquant p52 [1206, 1207]. **À droite**, une voie subalterne induite par différents traitements, analogue à la voie alternative, mais qui implique la phosphorylation de p105 par IKK $\beta$  [1208, 1209]. Ce procédé permet également la (re)génération de dimères NF- $\kappa$ B variés [1207]. Abréviations : D : *Death domain*; P : *PEST domain*;  $\kappa$ B : sous-unités NF- $\kappa$ B.

Afin d'exercer leurs effets transcriptionnels, les dimères NF- $\kappa$ B doivent transloquer au noyau, un procédé qui requiert chez cette famille la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS) à proximité du RHD (figure 26) [1149, 1210, 1211], ainsi que la présence de certaines importines  $\alpha$  [1212]. p65 effectue des allers-retours dans le noyau grâce à un signal d'exportation nucléaire [1213]. De plus, il est doté d'un signal de localisation nucléolaire (NoLS) [1214]. Ce type de signal permet la rétention et l'inhibition de facteurs de transcription dans le nucléole. NF- $\kappa$ B étant un facteur anti-apoptotique [1215], il semble que la rétention nucléolaire de p65 soit pro-apoptotique [1214].

Les I $\kappa$ B présentent des répétitions ankyrine<sup>44</sup> (ANK) en tandem, qui forment une structure en dentelle responsable de la liaison des différents dimères au niveau du NLS (figure 26) [1149], et ce, avec différentes affinités. RelB:p52, par exemple, s'associe très faiblement à I $\kappa$ B $\alpha$  [1177], mais est connu pour avoir une forte affinité pour I $\kappa$ B $\delta$ . Les I $\kappa$ B ne sont pas seulement des inhibiteurs de NF- $\kappa$ B, ils peuvent être vus comme des stabilisateurs de dimères essentiels à leur formation [1201]. Les répétitions ANK sont également présentes sur 2 précurseurs de NF- $\kappa$ B : p100 et p105. Il a récemment été découvert que ces derniers peuvent former des homodimères, et peuvent recruter différents NF- $\kappa$ B, autant par leur RHD que par leurs ANK, formant ainsi des complexes de haut poids moléculaire appelés I $\kappa$ Bsomes [1191, 1201]. La modulation de NF- $\kappa$ B est un procédé très complexe, de nature oscillatoire [1218], impliquant des compétitions entre dimères, différents allers-retours nucléaires, et la transcription *de novo* de certains membres (revu dans [1201] et [1219]).

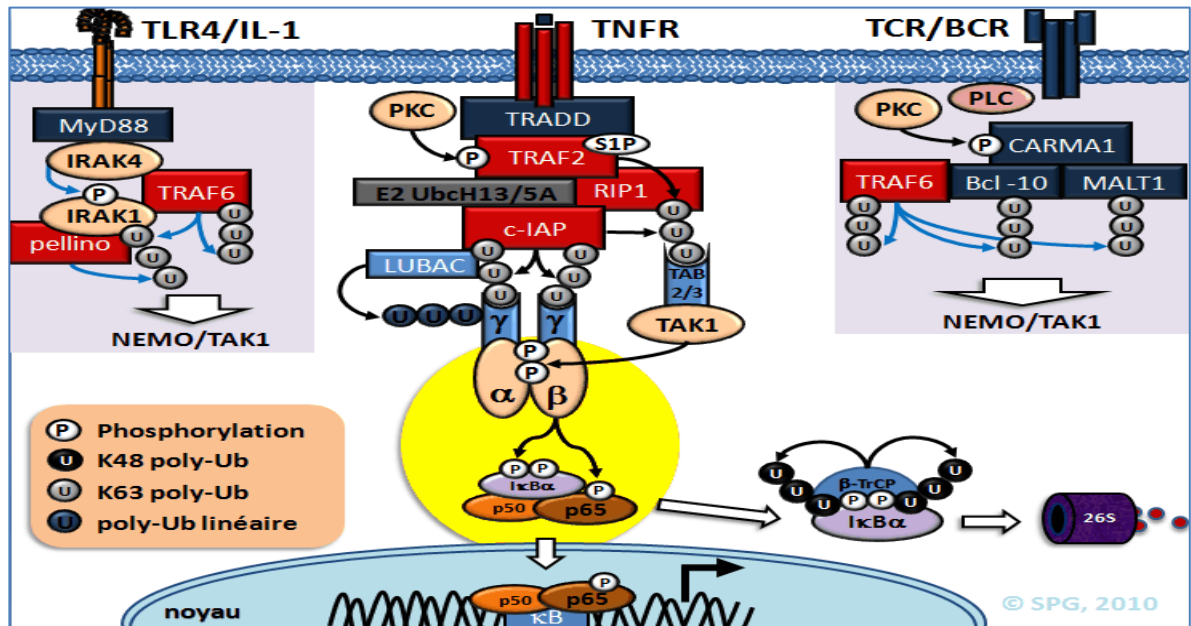
Finalement, certains I $\kappa$ B exercent des effets transcriptionnels positifs. Il est reconnu que I $\kappa$ B $\zeta$ , inductible par la voie TLR/IL-1 [1220] et qui possèderait un domaine de transactivation [1221], s'associe à différents facteurs de transcription pour induire l'expression de gènes [1222, 1223]. Son homologue Bcl-3 est à la fois un modulateur positif et négatif de la transcription (revu dans [1224]).

---

<sup>44</sup> L'ankyrine est une protéine du cytosquelette identifiée d'abord dans les érythrocytes [1216, 1217].

### 3.2.3 Voies d'activation de NF- $\kappa$ B

Nous avons maintes fois illustré, aux chapitres 1 et 2 de cette introduction, l'implication de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les processus inflammatoires. L'activation de NF- $\kappa$ B par les PAMPs et les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF est effectuée par le complexe IKK qui comprend IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , le partenaire obligatoire IKK $\gamma$ /NEMO, de même que d'autres protéines telles qu'ELKS [1225] et Hsp90 [1226]. Ceci est la voie classique ou canonique, responsable d'une activation rapide et forte de NF- $\kappa$ B, principalement de p50:p65. Nous présentons les grandes lignes de cette voie d'activation à la figure 28. Cependant, l'induction des différentes espèces de dimères de NF- $\kappa$ B ne se résume pas à cette voie d'activation. Ce fin contrôle implique de nombreuses voies alternatives dont plusieurs n'ont été caractérisées que récemment. La voie dénommée « alternative » ou non-canonique, implique un homodimère d'IKK $\alpha$  et ne nécessite pas la présence de NEMO (figure 27B, gauche). Le complexe IKK est également responsable de la maturation de p105 (figure 27B, droite). De plus, certains membres des familles I $\kappa$ B $\alpha$  et NF- $\kappa$ B peuvent être induits par des voies transcriptionnelles (RelB [1227], p100/p52 [1228], p105/p50 [1229] et I $\kappa$ B $\alpha$  [1230]), traductionnelles, ou impliquant la stabilisation du messenger (I $\kappa$ B $\zeta$  [1231]). Ceci est exemplifié dans la voie classique d'activation de NF- $\kappa$ B où le I $\kappa$ B $\alpha$  néo-synthétisé pourra transloquer au noyau et réprimer les actions transcriptionnelles de NF- $\kappa$ B [1232]. Finalement, différentes modifications post-traductionnelles modulent le comportement des différents NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B (figure 26). Nous présentons à la section suivante quelques mécanismes régulateurs de la sous-unité p65.



**Figure 28 : Voies d'activation du complexe IKK.**

L'activation du complexe IKK nécessite 2 événements majeurs : le recrutement de NEMO ( $\gamma$ ) et la phosphorylation des  $\text{IKK}\alpha/\beta$ . **Centre.** La signalisation du TNFR implique un complexe multi-protéique complexe comprenant TRADD [1233] et plusieurs E3 ligases (TRAF2 [1234], RIP1 [1235] et c-IAP [1236]). L'activation de TRAF2 nécessite une phosphorylation par PKC [1237] et la liaison de la sphingosine 1-phosphate (S1P) [1238]. Toutes ces E3 ligases peuvent avoir une activité de poly-ubiquitination en lysine (K) 63, qui ne module pas la dégradation, mais plutôt l'activité des protéines et leurs interactions (revu dans [1239]). Les E2 ligases Ubc13/H5A sont impliquées dans plusieurs procédés d'ubiquitination induits par le TNFR [1240, 1241]. Les c-IAP auraient une influence majeure en effectuant l'ubiquitination de RIP1 [1241]. Les protéines TAB2/3 peuvent lier les chaînes d'ubiquitines (Ubi) de RIP1 ou TRAF2/5 et ainsi recruter la kinase TAK1, qui est chargée de la phosphorylation d' $\text{IKK}\alpha/\beta$  [1242-1244] et d'autres kinases (voie JNK). NEMO comporte des domaines de liaison à Ubi, et peut être recruté à de nombreuses protéines ubiquitinées en K63 (revu dans [1245, 1246]). Le complexe LUBAC (HOIL-1L et HOIP) module l'ubiquitination linéaire de NEMO et est essentiel à l'activation du complexe IKK [1247]. **Gauche.** Voie d'activation du complexe IKK via la voie TLR/IL-1. L'adaptateur MyD88 interagit avec IRAK4 qui phosphoryle IRAK1. Les E3 ligases TRAF5 et Pellino modulent l'ubiquitination de IRAK1 qui peut ainsi recruter NEMO [1245]. **Droite.** Activation du complexe IKK via les BCR/TCR. L'activation d'une PLC et de PKC module un complexe multi-protéique qui implique CARMA1, MALT1 et Bcl-10 [1248]. TRAF6 peut être impliqué dans l'ubiquitination en K63 de MALT1 et de Bcl-10 [1249, 1250], qui peuvent alors recruter TAK1 ou le complexe IKK. **Note :** des chaînes Ubi libres peuvent activer TAK1 [1251], et cette dernière peut également être ubiquitinée et peut recruter IKK [1252]. Voir la section 1.3.2 pour d'autres voies (NODs, TLRs, RLR).

### 3.2.4 Régulation complexe de p65

Tel que présenté à la figure 28, l'activation du complexe IKK est un procédé impliquant de multiples modifications post-traductionnelles, ce qui inclut des phosphorylations et des ubiquitinations variées, le tout finement contrôlé par l'action de phosphatases (PP2A [1084], PTEN [1253]) et de dé-ubiquitinasés (A20 [1254, 1255], CYLD [1256]) dans le but ultime d'activer NF- $\kappa$ B (et possiblement d'autres substrats : figure 24). Or, la sous-unité p65 est également sujette à de multiples modifications post-traductionnelles (figure 26). p65 peut être phosphorylé sur au moins 9 sérines par au moins 13 kinases (revu dans [1198]), ce qui suggère que plusieurs voies de signalisation convergent vers cette même cible. C'est entre autres le cas de la sérine 536 du domaine de transactivation (figure 26, en haut à droite), ciblée par IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , les kinases IKK-related et RSK1. Cette phosphorylation très commune a toutefois un rôle qui commence à peine à être élucidé. En effet, il semble que p65 est assujéti à un code de phosphorylation (*phosphorylation code*, *barcode hypothesis*) qui détermine son comportement et/ou le profil des gènes qu'il pourra induire [1257, 1258]. Il a toutefois été suggéré que la phosphorylation de Ser-536 diminuait l'affinité du dimère NF- $\kappa$ B pour I $\kappa$ B $\alpha$  [1259] et augmentait son activité transcriptionnelle [1260] et son acétylation [1261, 1262]. Alors que la phosphorylation de Ser-276 est principalement activatrice [1189, 1263], celle de Ser-468 demeure controversée [1264, 1265] (tout comme Ser-536 [1123]). Par ailleurs, p65 est retrouvé acétylé sur de nombreux sites, et ceci a pour effet de diminuer sa méthylation, une modification qui serait requise pour son ubiquitination et sa dégradation subséquente [1266, 1267].

### 3.3 Activation d'IRF-3

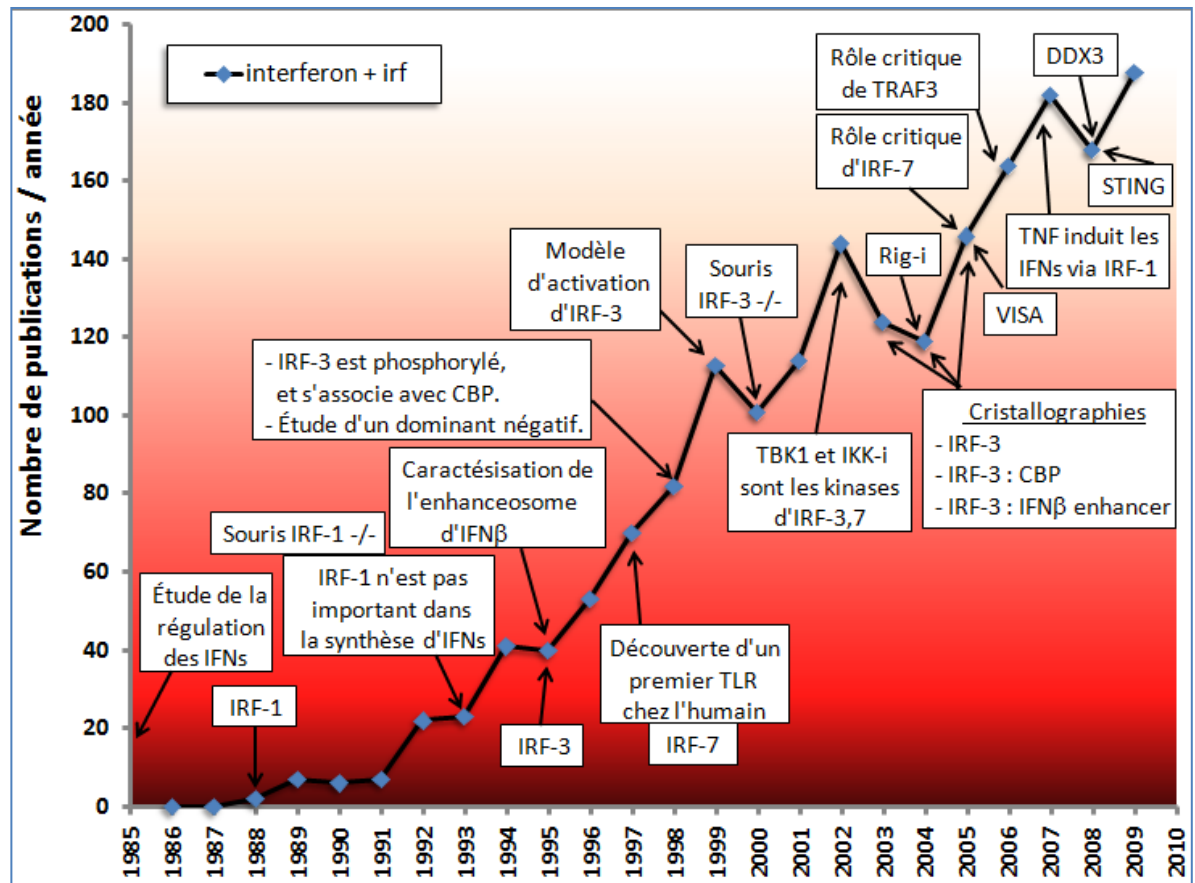
#### 3.3.1 De l'interféron aux IRFs

Il y a déjà 60 ans, un phénomène d'interférence entre virus avait été observé maintes fois dans différents systèmes [1268]. Par exemple, une infection avec un virus inactivé aux UV quelques temps avant une néo-infection avec un autre type de virus prévenait ou bloquait cette dernière [1269]. Ce sont Alick Isaacs et Jean Lindenmann qui étudièrent pour la première fois l'apparition d'un agent interférent, sa stabilité et ses effets. Ils le nommèrent interféron (IFN) [1270]<sup>45</sup>. Il a rapidement été montré que l'interféron ne bloquait pas seulement la synthèse d'ARN viraux [1273], mais également la synthèse d'ARNm dans des cellules cancéreuses [1274]. L'interféron apparaît donc dès son origine comme un agent antiviral et anti-tumoral (notamment pour le traitement d'infections aux virus oncogéniques [1275]).

Mais comment l'interféron est-il induit ? Il est montré que des intermédiaires de réplication viraux (ARNdb) [1276], le LPS [1277] et de nombreux pathogènes viraux, bactériens ou même des levures et des antibiotiques peuvent l'induire (revu à l'époque dans [1278]). Sa synthèse dépend d'une induction de la transcription, puisque l'actinomycine D inhibe sa production [1279]. Les IFNs se divisent par la suite en 3 classes : les interférons de type I (les IFN $\alpha$  (14 types), IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$ , IFN $\delta$ , IFN $\omega$  et IFN $\tau$ ), de type II (IFN $\gamma$ ) et de type III (IFN $\lambda$ 1,2,3) [1280]. Chaque classe d'IFN lie un récepteur dimérique distinct [309, 1281]. Nous nous limiterons dans les sections futures à la régulation des IFNs de type I, plus particulièrement celle de l'IFN $\beta$ . Il est intéressant toutefois de constater que lors de leur caractérisation initiale, les IFNs semblaient être produits par des types cellulaires distincts : l'IFN $\alpha$  est produit par les leucocytes, l'IFN $\beta$  par les fibroblastes [1282], et l'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T [1283]. Ces résultats suggèrent en effet l'aspect ubiquitaire de l'IFN $\beta$ .

---

<sup>45</sup> Republié plusieurs fois comme papier classique [1271, 1272].



**Figure 29 : Survol des découvertes charnières dans les domaines d'étude des IRFs.**

Ce graphique met en relief l'importance qu'accorde la recherche actuelle à l'étude des IRFs. Les détails se retrouvent dans le texte de ce chapitre. Pour générer ce graphique, nous avons effectué une recherche dans Pubmed tel que décrit à la figure 19.



L'étude de la régulation des promoteurs des IFN $\alpha/\beta$  débute dans les années 1980. Ils contiennent un motif régulateur conservé nommé VRE (*virus responsive element*) ou IRE (*interferon gene regulatory element*) [1284-1286]. L'IFN $\beta$  est de plus régulé par NF- $\kappa$ B [1145]. Tom Maniatis décrit pour la première fois en 1985 un élément *enhancer* du promoteur d'IFN $\beta$ . Cet élément, dont l'efficacité minimale est de 14 pb, a la capacité d'induire la transcription, peu importe son orientation ou son emplacement dans les 1000 pb en amont du premier ATG [1287]. Il caractérisera par la suite cet *enhancer*<sup>46</sup> et montrera qu'il peut lier différents facteurs [1289] (voir figure 32). C'est Tadatsugu Taniguchi qui caractérise le premier *interferon regulatory factor* (IRF), IRF-1 [1290, 1291], un facteur inductible (transcriptionnellement) qui serait responsable de la transcription des IFN $\alpha/\beta$  et d'autres molécules reconnues pour être régulées par les IFNs (ex : MHC classe I). Après avoir montré un rôle critique d'IRF-1 dans la synthèse d'IFN $\beta$  suite à une infection virale ou une stimulation au poly(I:C) [1292], l'utilisation de souris IRF-1 -/- montre plutôt que la synthèse d'IFN $\beta$  reste normale en condition infectieuse, ce qui suggère qu'un autre IRFs est impliqué [1293]. Il apparaît par la suite que les IRFs forment une famille de 9 facteurs de transcription homologues, et leur caractérisation montrera qu'ils ont tous leurs particularités (tableau 8). IRF-3 est identifié en 1995 par l'équipe de Paula Pitha-Rowe [1294], et s'avèrera être l'un des principaux régulateurs de la synthèse d'IFN $\beta$  avec NF- $\kappa$ B. Nous consacrons la prochaine section à son étude.

---

<sup>46</sup> Tom Maniatis publiera une vingtaine de papiers sur l'enhancer d'IFN $\beta$ , ce qui sera couronné par la cristallisation de l'*enhancer* occupé par ses facteurs de transcription en 2004 [1288].

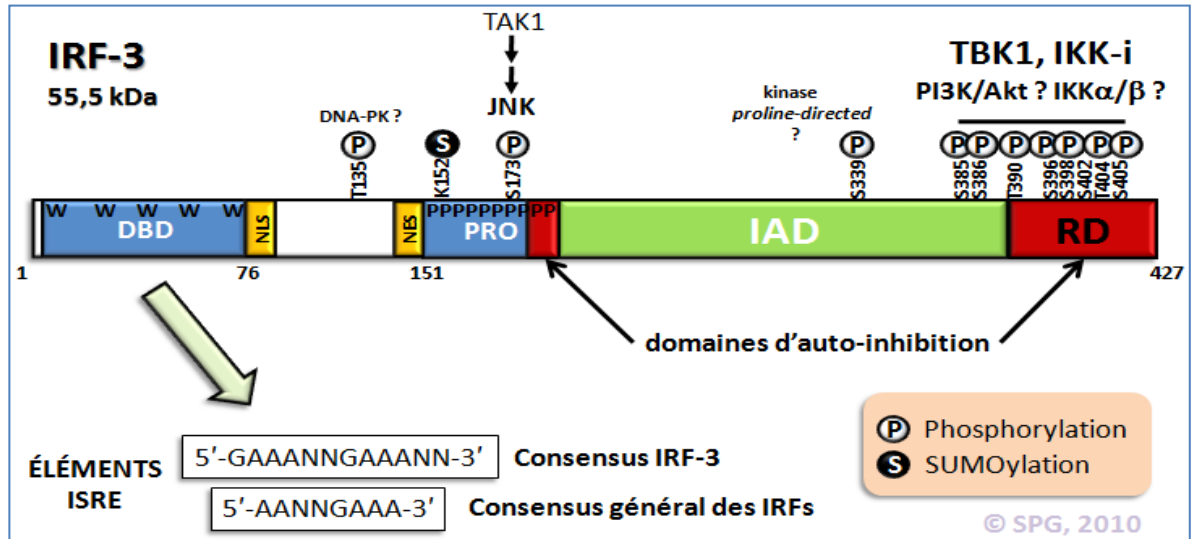
IRFs	Constitutif	Inductible	Exemples de gènes cibles (protéines)	Vagues IFNs		Inflammation	Apoptose	Promouvoit T <sub>H</sub> 1	Développement Différentiation & immunitaires
				1 <sup>ère</sup>	2 <sup>e</sup>				
<b>1</b>		LPS IFN $\gamma$ TNF	IFN $\beta$ , iNOS, gp91PHOX, IL-12, IL-15, caspase-1 MMP-9	IFN $\gamma$ TNF					
<b>2</b>			IL-12, IL-1 $\beta$ (PU.1)	Inhibe			Inh.		
<b>3</b>			IFN $\beta$ , IFN $\alpha$ 1, ISG56, IP-10, RANTES, MIG, MMPs, MCP-1, MIP-1, IL-6, IL-8, IL-12, Noxa		Peut être dégradé				
<b>4</b>	L DC	TLR	IL-4, GATA3, CD23 IL-1 $\beta$ (PU.1)			Inh. IRF-5			
<b>5</b>	L DC M $\phi$	IFNs p53	IFN $\beta$ , IFN $\alpha$ 8, RANTES, MIP-1 $\beta$ , MCP-1, IL-8, IL-6, IL-12, TNF, MIP-2 $\alpha$	NOD2 TLR7 M $\phi$		TLR7 TLR9			
<b>6</b>		p63 [1295]	Développement [1296]	?	?	?	?	?	?
<b>7</b>	LB DC	IFNs	IFN $\beta$ , Tous les IFN $\alpha$ , IP-10 ? TRAIL ?	DC		?			M $\phi$ [1297]
<b>8</b>	L, DC M $\phi$	LPS IFN $\gamma$	IL-12, IL-18, MMP-9 OAS, MX1, IL- $\beta$		DC				
<b>9</b>			Plusieurs centaines incluant OAS, PKR, IRF-7			Inh. IL-8			

**Tableau 8: Famille des IRFs et chevauchement de leurs rôles.**

L'importance accordée à un IRF dépend de son niveau d'expression dans un type cellulaire donné. Les IRFs 4,5,7 et 8, par exemple, sont surtout exprimés dans divers leucocytes. D'autres sont inductibles en condition inflammatoire. Bien que tous les IRFs peuvent théoriquement lier des séquences ISRE (5'-GAAAN(T/C)-3'), certains peuvent agir en tant que répresseurs (IRF-2, IRF4, IRF-8) ou lier des motifs composites en collaboration avec PU.1 [1298]. IRF-3 peut également être répresseur [1299]. Les IRFs induisent, avec un certain recouvrement, de nombreux gènes et interviennent dans de multiples réponses physiologiques. Les IRFs peuvent de plus former des hétérodimères et possiblement réguler finement la transcription [1300-1303]. Nous décrivons les 2 phases d'induction des IFNs à la figure 31. IRF-3 a un rôle majeur lors de la première synthèse d'IFNs. Cependant, IRF-7, qui est habituellement faiblement exprimé, l'est davantage dans les DC et devient le facteur majeur de cette première vague [149]. IRF-5 [1304, 1305], IRF-1 [1306, 1307] et IRF-8 [1308] participent également à la synthèse des IFNs dans des types cellulaires précis et/ou lors de traitements précis. Références générales : [1309, 1310]. Abréviations : Inh. : inhibition; L : lymphocyte.

### 3.3.2 De la caractérisation d'IRF-3 à ses kinases

Lors de sa caractérisation initiale, il a été montré qu'IRF-3 avait la capacité de lier les *interferon-sensitive response elements* (ISRE) et de transactiver certains promoteurs des IFNs de type 1 (IFNB plutôt que IFNA4), et ce, en coopération avec NF- $\kappa$ B [1294, 1311]. Suite à une infection, ce facteur cytoplasmique latent transloque au noyau cellulaire, se présente sous une forme phosphorylée, et s'associe avec p300/CPB pour former le complexe DRAF (*double-stranded RNA-activated factor 1*), impliqué dans la transactivation de gènes spécifiques [1312]. L'équipe de Takashi Fujita caractérise alors certains des domaines d'IRF-3, dont son NES (qui module sa localisation cytoplasmique) et son domaine de liaison à l'ADN (DBD). Leur étude montre que l'expression ectopique de IRF-3 exacerbe l'induction des IFN $\alpha/\beta$  par le NDV (*New Castle disease virus*), et que l'usage d'un IRF-3<sup>58-427</sup> (ou  $\Delta$ N-IRF-3), sur lequel le DBD est absent, agit en tant que dominant négatif [1313]. Rongtuan Lin et John Hiscott identifient les résidus phosphorylés à l'extrémité C-terminale d'IRF-3 (figure 30) et démontrent leur importance dans sa translocation nucléaire, sa liaison à l'ADN et à CPB en effectuant diverses substitutions [1314]. Ces phosphorylations modulent également sa dégradation. La même équipe fournit par la suite un modèle séquentiel crédible du processus d'activation d'IRF-3, où la phosphorylation induit un changement conformationnel nécessaire à son homodimérisation (figure 31) [1315]. Grâce à la génération de souris IRF-3  $-/-$ , l'équipe de Tadatsugu Taniguchi parvient à fournir un modèle convainquant d'induction des IFN $\alpha/\beta$  en 2 étapes, tel que présenté à la figure 31, et qui complète le modèle antérieur de David Levy [1316, 1317]. La course aux kinases d'IRF-3 (VAK, *virus-activated kinases* [1318]) est alors lancée, ce qui mènera Marc Servant, alors chez John Hiscott, à l'identification de voies menant à l'activation d'IRF-3 ainsi que des résidus phosphorylés critiques à son activation (ex : Ser-396) [1319, 1320].



**Figure 30: Le facteur de transcription IRF-3 : domaines et modifications post-traductionnelles.**

IRF-3 possède un DBD conservé chez les IRFs avec 5 tryptophanes (W). Contrairement à d'autres IRFs, il est cru qu'IRF-3 est plus sélectif quant à sa capacité à lier les éléments ISRE. En effet, la mutation de certaines paires de bases dans le consensus présenté affectera grandement la capacité d'IRF-3 à transactiver les gènes [1321] (revu dans [1322]). Il possède un NLS [1323] et un NES [1313], et peut donc faire des allées et venues dans le noyau. L'utilisation de leptomycine B entraîne d'ailleurs une accumulation nucléaire d'IRF-3 [1323]. Son extrémité C-terminale régulatrice présente de nombreux résidus phosphorylés suite à une infection virale. L'expression ectopique de certains mutants Ser→Ala exerce des effets dominants négatifs (396A, 2A, 5A, etc.) [1319]. Inversement, les mutations Ser→Asp de certains résidus entraînent une activation constitutive (S396D, 5D) [1319, 1324]. D'autres résidus sont ciblés par phosphorylation. La Ser-339 semble jouer un rôle important dans l'activation d'IRF-3 en recrutant la prolyl isomérase Pin1 [1325, 1326]. La Ser-173 est ciblée par une voie TAK1-JNK et est nécessaire à l'activation d'IRF-3 [1327]. IRF-3 est également acétylé par CPB/p300 [1328], une modification nécessaire à sa capacité de lier l'ADN. Notons cependant que les lysines impliquées ne sont pas caractérisées. Finalement, IRF-3 peut être SUMOylé, une modification qui entraîne son inhibition [1329]. Abréviations : DBD : *DNA binding domain*; PRO : *proline-rich region*; IAD : *IRF association domain*; RD : *regulatory domain*.

TBK1 (NAK/T2K) a été découverte par 3 groupes indépendants en 1999-2000 [129-131]. IKK-i (IKKε) a été découverte en 1999 par l'équipe de Shizuo Akira [132]. Curieusement, ces kinases étaient liées à leur origine à la voie NF-κB. TBK1, une kinase

anti-apoptique liée à TANK et TRAF2 [129, 131], avait la capacité de phosphoryler IKK $\beta$  et I $\kappa$ B $\alpha$  [130]. Bien que la surexpression de TBK1 induise l'activation de NF- $\kappa$ B, cette kinase ne semble pas être importante dans l'activation de NF- $\kappa$ B par le TNF, l'IL-1 ou le CD40L [131]. IKK-i, quant à elle, était surtout exprimée dans les cellules immunitaires et son expression était inductible par le LPS, le TNF, l'IL-1 et l'IL-6. Cependant, il semble que ces 2 kinases phosphorylent I $\kappa$ B $\alpha$  préférentiellement sur 1 seul site, soit la Ser-32 ou la Ser-36, alors que la dégradation de ce dernier nécessite la phosphorylation des 2 résidus [1159]. Ceci suggère que le rôle de ces kinases dans la voie NF- $\kappa$ B implique d'autres substrats. Justement, de récentes évidences suggèrent que ces 2 kinases peuvent phosphoryler différentes sous-unités NF- $\kappa$ B, principalement p65 [1115, 1260, 1330-1332] (notamment à la sérine 536) et c-Rel [1111]. Fait intéressant, une étude récente montre qu'IKK-i s'associe à la chromatine de gènes ciblés par NF- $\kappa$ B [1333]. Nous rediscuterons du rôle des kinases IKK-related dans le cancer en fin de chapitre, où NF- $\kappa$ B est sans contredit un médiateur important de leur effet oncogénique.

2 équipes indépendantes montrent simultanément par la suite que ces kinases IKK-related peuvent phosphoryler IRF-3 et IRF-7, et sont donc les VAK recherchées [1125, 1334]. Nous allons décrire dans la prochaine section la voie classique TBK-IRF-3 en la plaçant dans un contexte infectieux, puis illustrerons différents mécanismes menant à l'activation des kinases IKK-related, avant de les situer dans un contexte de cancer.

### **3.3.3 IRF-3 : un initiateur de la réponse antivirale encore peu connu.**

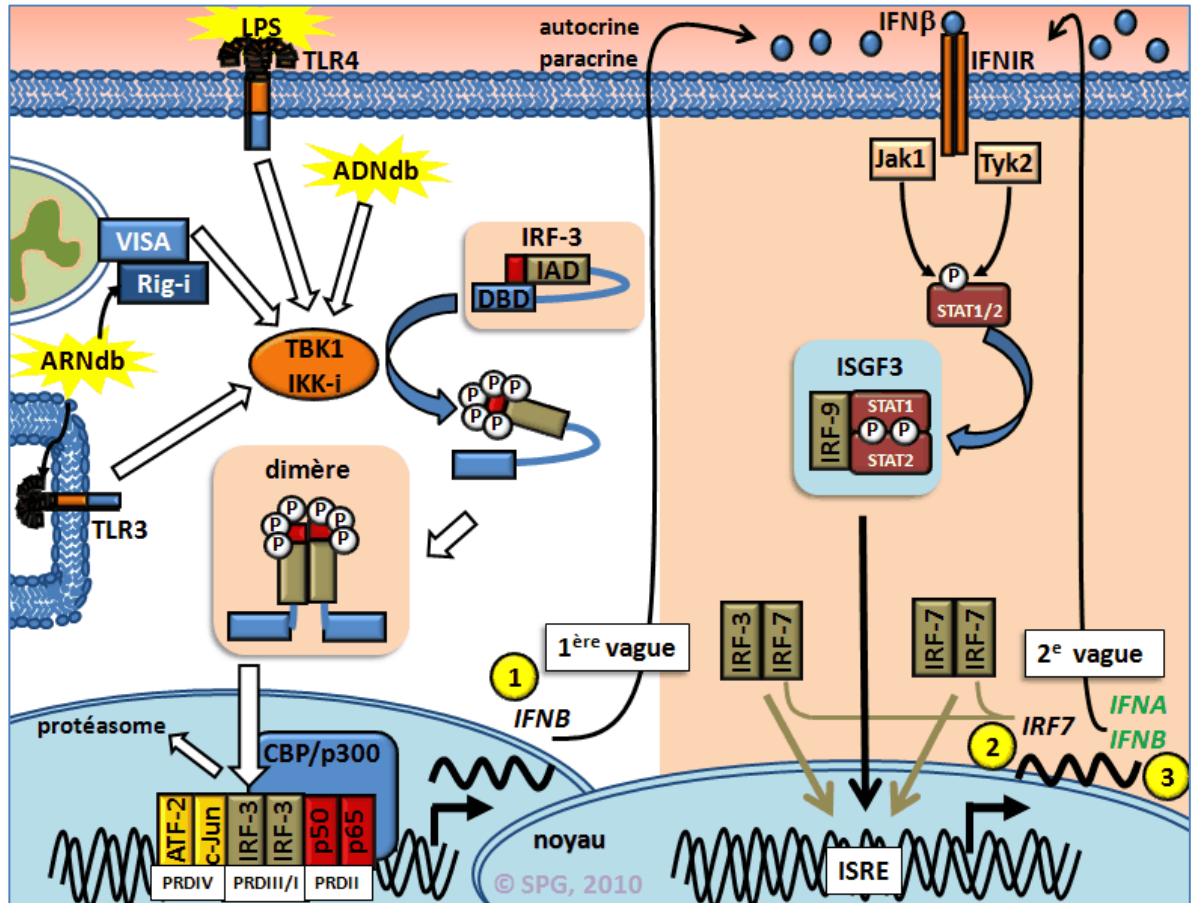
Suite à la reconnaissance de PAMPs viraux ou bactériens par des PRRs spécifiques (tableau 1), il y aura activation de voies de défense variées. Le système IFN est l'un des mieux caractérisés. Tel que présenté à la figure 31, les interférons de type I tels que les IFN $\alpha/\beta$  se lient au récepteur IFNAR, ce qui induit le recrutement et l'activation des protéines kinases Jak1 et Tyk2, impliquées dans la phosphorylation de STAT1 et STAT2 [309]. STAT1/2 forment ensuite un complexe avec IRF-9/p48/ISGF3 $\gamma$  (tableau 8),

traditionnellement appelé ISGF3<sup>47</sup> [1336]. À la manière des IRFs, ISGF3 induit la transcription de gènes en transloquant au noyau, en s'associant à des éléments ISRE et en recrutant des co-activateurs tels que p300/CBP [1337]. Notons que l'activation de ces ISRE via ISGF3 ne fait pas l'exclusivité des IFNs de type I. Les IFNs de type III exercent des effets similaires, mais leur mode d'induction et leurs récepteurs sont différents. Cette classe de cytokines, prise actuellement par la recherche, ne sera pas abordée dans le présent ouvrage (voir [1281]).

IRF-3 apparaît comme un initiateur essentiel de la synthèse d'IFNs de type I. Une fois mise en marche, la réponse IFN s'auto-amplifie tel qu'illustré à la figure 31, et sa durée sera certainement influencée par la dégradation d'IRF-3. À cet effet, il est intéressant de constater que certains virus ont élaboré des stratégies visant à bloquer l'activation d'IRF-3 [1338-1340] ou à entraîner sa dégradation [1341-1343]. Bien que l'effet antiviral d'IRF-3 soit dépendant de la synthèse d'IFNs, IRF-3 a la capacité intrinsèque d'induire l'expression de certains ISGs et de cytokines en se liant au promoteur de ces gènes (une douzaine sont mentionnés tableau 8). Les essais rapporteurs faisant l'usage d'éléments ISRE issus de ces promoteurs (par exemple IFIT1/ISG56)) sont d'ailleurs devenus des techniques sensibles pour détecter l'activation d'IRF-3 [1344]. Cependant, il serait hâtif de conclure quant à la régulation exclusive de certains gènes par IRF-3. En effet, il n'est pas rare d'observer la présence d'éléments NF- $\kappa$ B au sein de ces promoteurs (voir figure 32). De manière générale, la présence d'éléments de réponse très distants, ou se retrouvant même dans les introns, peuvent complexifier l'étude de la régulation des gènes. Mentionnons toutefois que l'équipe de Ganes Sen clame que les gènes IFIT1, IFIT2 et ISG15 sont IRF-3-dépendants et NF- $\kappa$ B-indépendant, du moins lors d'une infection au virus de Sendai (SeV) [1345]. La technologie microarrays parvient peu à peu à indiquer le profil de gènes dépendants d'IRF-3, qu'ils aient un rôle dans l'immunité, l'apoptose ou la prolifération cellulaire [1346].

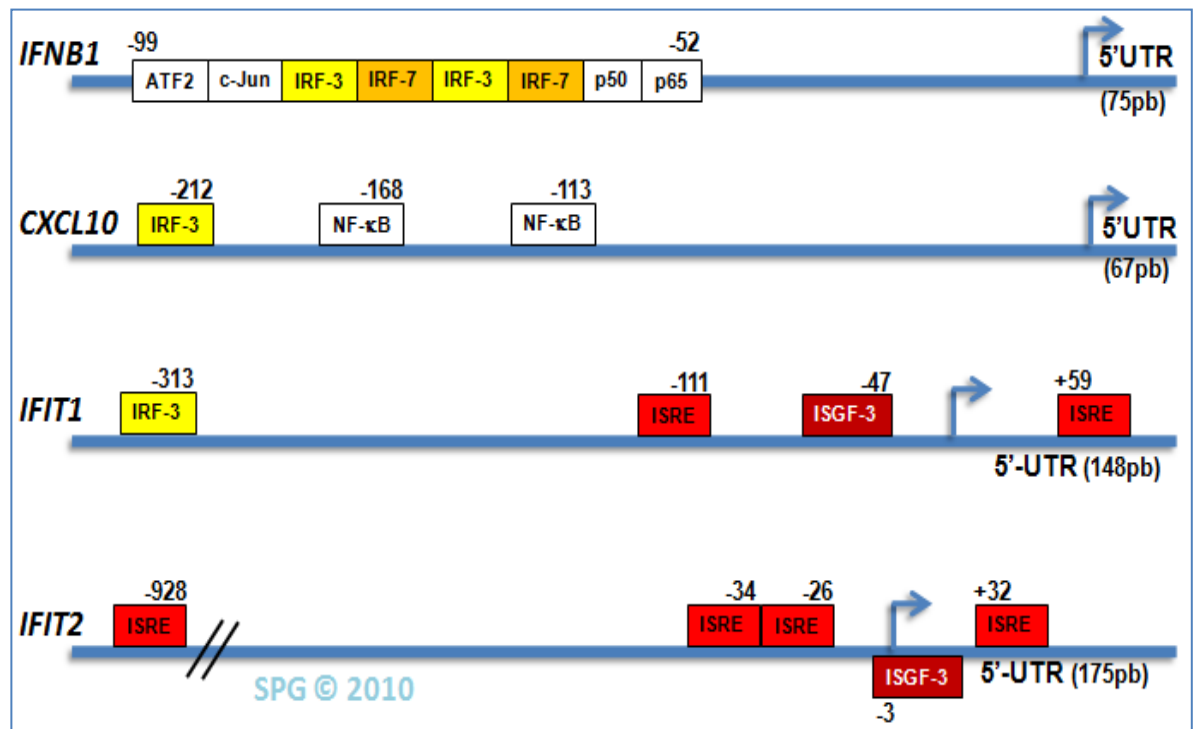
---

<sup>47</sup> ISG signifie *interferon stimulated gene*. Il y a plusieurs centaines d'ISGs [1335]. ISGF signifie *ISG factor*, un complexe de régulation transcriptionnelle des ISGs.



**Figure 31 : Contrôle de l'activation d'IRF-3 et phases d'induction des IFNs de type I.**

Suite à la reconnaissance d'un motif pathogène, des PRRs spécifiques induisent l'activation du facteur de transcription IRF-3. Ce facteur cytosolique latent est retrouvé sous une forme repliée où son domaine de liaison à l'ADN est masqué. Suite à la phosphorylation par les kinases IKK-related en C-terminal, IRF-3 subit un changement conformationnel, dimérise et transloque au noyau. IRF-3 lie des éléments ISRE au sein de promoteurs précis et s'associe à des coactivateurs nucléaires tels que CBP et p300. IRF-3 induit l'expression de IFN $\beta$  (et certains IFN $\alpha$ ) qui agit de manière autocrine et paracrine en liant le récepteur IFNAR, composé des protéines transmembranaires IFNAR1 et IFNAR2 qui sont liées aux protéines Jak1 et Tyk2. IFN $\beta$  induit l'activation d'ISGF3 (voir texte), mais également des voies PI3K/Akt et p38 (non-illustrées, voir [1347, 1348]). ISGF3 a la capacité d'induire l'expression d'IRF-7 et différents ISGs aux rôles antiviraux variés. IRF-7 peut alors agir en tant qu'homodimère ou hétérodimère pour induire l'expression d'une deuxième vague d'IFNs. À long terme, IRF-3 est ubiquitiné et dégradé via le protéasome [1349], ce qui modulera l'ampleur de la réponse antivirale.



**Figure 32 : Éléments ISRE retrouvés au sein de certains promoteurs physiologiques connus pour être régulés par IRF-3.**

L'exemple le plus frappant d'élément ISRE se retrouve dans le promoteur *IFNB1*, au sein de la séquence de l'enhanceosome : "ATGACATAGGAAAAGTAAAGGGAG AAGTGAAAGTGGGAAATTCCTCT", dont les éléments sont identifiés sur la figure (voir [1350]). Les autres éléments identifiés sur cette image ont été obtenus grâce au logiciel TESS, en se limitant à des séquences inférieures ou égales aux 1000 premiers nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Certains éléments ont été identifiés manuellement par la recherche des consensus IRF-3 et IRFs (voir figure 30). Note : *IFIT1* est le gène encodant la protéine IFIT1/ISG56, *IFIT2* est celui encodant ISG54, *CXCL10* celui encodant IP-10.

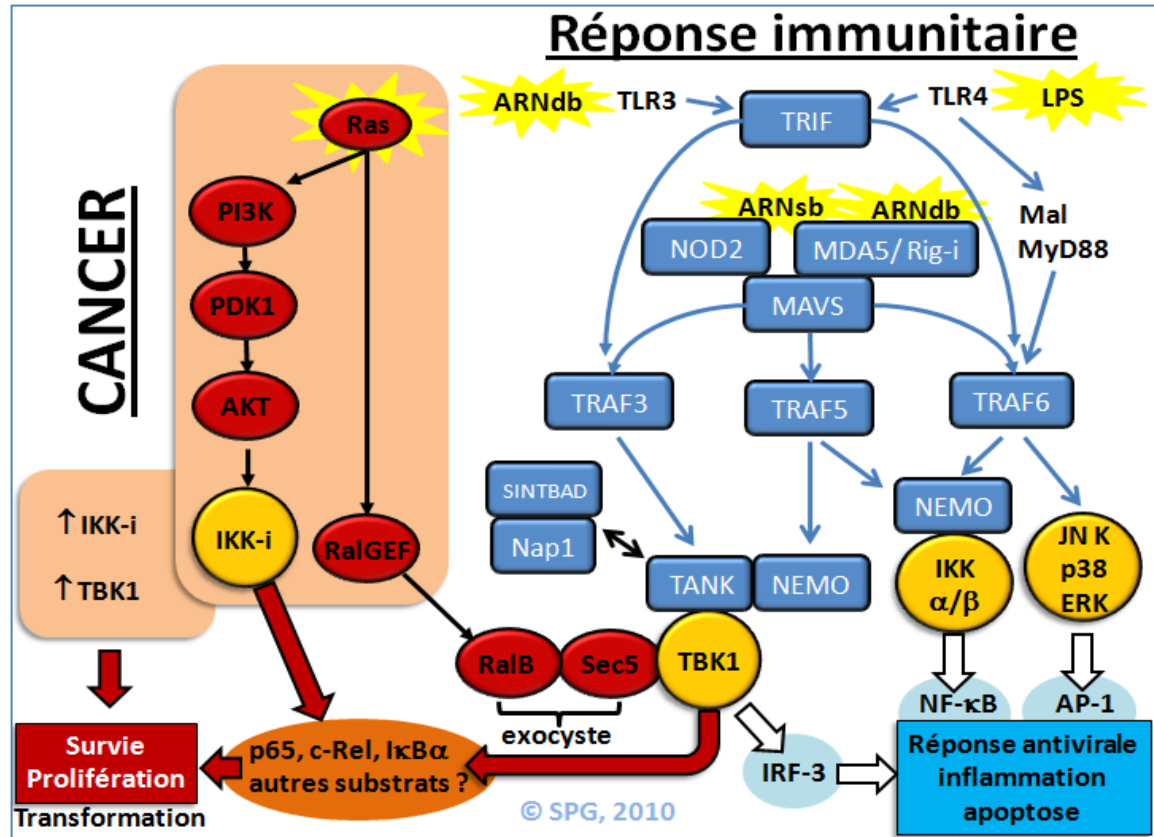
Des données récentes montrent qu'IRF-3 peut également exercer un rôle pro-apoptotique indépendamment de son activité transcriptionnelle [1351]. Ainsi, IRF-3 apparaît comme un facteur de transcription polyvalent, mais dont les effets sont encore peu explorés dans un contexte d'inflammation chronique. Quelques études intéressantes soulignent son rôle dans l'arthrite rhumatoïde [1352, 1353]. Tel que mentionné à la section précédente, IRF-3 agit de manière coopérative avec d'autres facteurs de transcription tel



que NF- $\kappa$ B. De plus, il a été montré qu'IRF-3 modulait l'expression de gènes qui ne contiennent pas d'élément ISRE tel que MMP-3 et MMP-9 [1353]. Les auteurs de cette intrigante étude montrent que la liaison de c-Jun sur des éléments AP-1 de l'ADN est diminuée de 52% lors d'un *knockdown* du gène *IRF3*. La voie TAK1-JNK étant connue depuis peu pour agir de manière synergique sur l'activation d'IRF-3 en entraînant sa phosphorylation en N-terminal au niveau de la sérine 173 [1327], il semble qu'IRF-3 soit un élément important de la réponse au stress. Il est notable que de multiples inducteurs d'IRF-3 non viraux entraînent sa phosphorylation en N-terminal, tels que le sorbitol, le PMA et le TNF [1320], de même que l'AngII (Gravel SP & Servant MJ, résultats non publiés). La potentialisation des effets d'IRF-3 est donc potentiellement sensible à l'environnement tissulaire, et tout ceci nous porte à croire qu'en contexte d'inflammation chronique, les effets antiviraux et pro-inflammatoires d'IRF-3 oeuvreront de pair avec la para-inflammation.

### **3.4 Voies d'activation des kinases IKK-related et rôles émergents dans le cancer et la réponse hypoxique.**

Découvertes depuis peu, les kinases IKK-related révèlent progressivement différentes facettes de leur complexe visage, qui débordent sans conteste du cadre de l'immunité innée. C'est en traitant sommairement de ces nouveaux rôles, plus particulièrement au niveau du cancer, que nous souhaitons clore cette introduction. Tel qu'illustré à la figure 33, l'activation des kinases IKK-related est une voie de l'immunité innée spécifique à certains pathogènes, donc à certains PAMPs uniquement. Par exemple, l'ARNdb, un intermédiaire de réplication des virus à ARNsb, ou simplement le génome des virus à ARNdb, est une structure connue depuis plus de 40 ans pour induire la réponse interféron.



**Figure 33 : Voies d'activation des kinases IKK-related dans l'immunité innée et le cancer.**

Certains PAMPs seulement peuvent entraîner l'activation des kinases TBK1 et IKK-i, tel qu'illustré ci-haut (voir sections 1.3.2 et 6.1.2). L'ADNdb, non-illustré ici, peut également induire leur activation, sujet que nous abordons dans la discussion de cette thèse, en mentionnant de nouveaux acteurs de la réponse immunitaire innée tels que DDX3 et STING (section 6.1.2). L'activité de TBK1 dépend de plusieurs molécules en amont, l'une des plus importantes étant TRAF3, connue pour être activée via la voie TRIF et la voie des RLRs. Une équipe a également montré que TRAF5 pouvait être impliqué dans l'activation d'IRF-3 [1354]. Alors que TRAF3 induit spécifiquement l'activation d'IRF-3, l'activation de TRAF6 mène à l'activation des kinases IKK et des MAPK, de sorte que l'activation spécifique des kinases IKK et IKK-related est dissociée en contexte infectieux. Il a été montré récemment que les composantes de l'exocyste RalB et Sec5 étaient importantes pour l'activation d'IRF-3 lors d'une infection virale [1355] (voir le texte). Dans des cellules cancéreuses, on assiste souvent à une activation constitutive de la voie Ras [1356], et ceci mène à une activation des kinases IKK-related par des mécanismes qui semblent distincts. Le mécanisme par lequel ces kinases entraînent la survie des tumeurs reste peu connu, et laisse à penser que certains substrats de la voie NF-κB, ou d'autres non-identifiés, sont responsables des effets transformants de ces kinases.

Nous avons abordé à la figure 5 du chapitre 1 les fondements principaux de la réponse à l'ARNdb, initiée par l'hélicase Rig-i et l'adaptateur mitochondrial VISA. Les TLR3 et 4, qui reconnaissent respectivement l'ARNdb extracellulaire (ou endosomal) et le LPS bactérien, mènent également à la synthèse d'interférons. Les molécules TRIF et TRAF3 jouent un rôle majeur dans cette signalisation. Finalement, l'ADNdb, retrouvé dans le génome des virus à ADN tel que les *herpesviridae* [1357], les adénovirus [1358], mais également chez certaines bactéries intracellulaires telles que *Listeria monocytogenes* [1359] et *C. pneumoniae* [1360], contribuent de manière importante à la synthèse d'IFN $\beta$ . C'est grâce à une orchestration moléculaire complexe dont plusieurs détails nous échappent encore que ces PAMPs induisent l'activation des kinases TBK1 et IKK-i, ce qui mène à l'activation d'IRF-3. Les progrès dans ce domaine d'étude sont toutefois si rapides que nous allons discuter, suite à la présentation de nos résultats, des plus récentes découvertes intimement reliées à nos recherches sur le HCMV (section 6.1.2).

Nous avons mentionné précédemment que les kinases IKK-related n'avaient pas été identifiées de prime abord en tant que kinases de la réponse interféron. L'induction de la voie NF- $\kappa$ B par les deux kinases (et non la réponse interféron [1361]) les implique sans aucun doute dans la tumorigénèse (revu en détail dans [1362] et [1130]). La voie NF- $\kappa$ B est une voie de signalisation importante dans l'initiation et de développement des cancers [1363], et la délétion conditionnelle d'*Ikkkb* dans les souris diminue considérablement l'incidence des tumeurs [1364]. Il a été montré que NF- $\kappa$ B était impliqué dans la tumorigénèse induite par différents oncogènes dont Ras (principalement les formes HRas et KRas) [1365, 1366]. Or, de récentes études lient les 2 kinases IKK-related aux effets transformants de Ras [1355, 1361, 1367]. En se basant sur les différents résultats générés par ces études, nous avons situé l'emplacement possible des kinases IKK-related dans la voie Ras à la figure 33. À cet effet, TBK1 occupe un emplacement très particulier au sein de l'exocyste, un complexe protéique impliqué dans le recrutement membranaire de vésicules, et qui semble important pour la polarisation cellulaire et la survie (revu dans [1368, 1369]). L'exocyste est modulé par de nombreuses GTPases dont RalB, qui est un

effecteur des RasGEF (qui font un lien entre Ras et Ral). TBK1 interagit à cet effet avec Sec5, l'une des 8 composantes principales de l'exocyste [1355]. De plus, TBK1 phosphoryle Sec5, ce qui a un impact non seulement sur la transformation cellulaire, mais également sur la réponse immunitaire innée. Sec5 est donc un partenaire de TBK1 dont le mécanisme d'action reste mal défini. Une récente étude appuie cependant son rôle dans l'immunité innée [1107].

L'expression de IKK-i est induite dans de nombreuses lignées cancéreuses et dans différentes tumeurs [1370], notamment dans les gliomes [1371], le cancer des ovaires [1372] et le cancer du sein [1361]. En ce qui concerne le cancer du sein, il a été montré dans une étude qu'*IKBKE* (le gène d'IKK-i) était amplifié en de multiples copies dans 16,3% des lignées cancéreuses et dans 30% des tumeurs primaires [1361]. L'expression de TBK1 est également à la hausse dans plusieurs cancers [1367, 1373]. Cependant, il n'existe pas d'évidence quant à l'amplification génomique de *TBK1*.

Finalement, nous avons abordé les fondements de la réponse hypoxique au chapitre 1, en expliquant la modulation multidimensionnelle du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , et en la situant dans un contexte d'inflammation chronique (chapitre 2). Il est clair que les kinases IKK $\alpha/\beta$  sont impliquées dans l'induction transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  par NF- $\kappa$ B [539, 540], ce qui renforce leur rôle dans l'inflammation et le cancer. Or, pouvons-nous en dire autant des kinases IKK-related, également reconnues pour moduler la voie NF- $\kappa$ B ? Bien qu'aucune équipe n'a montré à ce jour la régulation de HIF-1 $\alpha$  par ces kinases, une étude intéressante montre que TBK1, de même que TRIF et IRF-3, sont des inducteurs de l'angiogenèse [1373], ce qui complète en quelque sorte une étude antérieure qui montre qu'un inhibiteur de l'angiogenèse, le SU6668, cible entre autres TBK1 [1374]. Les auteurs montrent que la surexpression de TBK1 dans différentes lignées cellulaires induit la sécrétion de facteurs solubles qui stimulent la prolifération de HUVECs, et ceci serait indépendant de NF- $\kappa$ B. Cette étude montre également que l'ARNm de *TBK1* peut être induit par une dose massive de cobalt, et qu'il est retrouvé à la hausse dans des tumeurs solides du sein ou du colon.

### 3.5 Retour sur les idées directrices des 3 chapitres

Durant ces 3 chapitres d'introduction, nous avons visité les bases moléculaires de l'inflammation et les avons situées dans un contexte d'inflammation chronique, plus particulièrement dans l'AT, où l'Ang II et le HCMV nous ont servi d'exemple. Alors que l'AngII est une hormone qui adopte les traits d'une cytokine pro-inflammatoire grâce à l'activation, entre autres, de la voie NF- $\kappa$ B par des mécanismes obscurs, le HCMV est pro-inflammatoire par des mécanismes tout autant obscurs, qui semblent être mis en branle à différents niveaux de sa biologie : l'entrée cellulaire et/ou la réplication. Ces deux agents immunostimulants trouvent en la VSMC une cible de choix pour induire la sécrétion de cytokines, ce type cellulaire étant d'ailleurs au cœur de la pathogenèse de l'AT. L'étude des facteurs de risque de l'AT est une source importante de renseignements sur les bases moléculaires sous-jacentes aux pathologies chroniques. Puisque ces acteurs agissent le plus souvent en coopération et/ou en synergie avec d'autres facteurs, l'inflammation locale doit désormais être vue dans le contexte de l'être humain entier, où la para-inflammation influencera le devenir d'une inflammation aiguë ou bénigne.

Tout au long de cette introduction, nous nous sommes efforcés de mettre en relief l'importance de la réponse hypoxique au sein des processus inflammatoires, que ce soit dans l'AT ou le cancer. Cette réponse, rappelons-le, ne fait pas l'exclusivité du stress hypoxique, puisqu'elle est également induite par différents agents biologiques (facteurs de croissance, cytokines) et certains agents pathogènes ou PAMPs. L'inflammation étant de plus intimement liée à la progression du cancer, la réponse hypoxique apparaît comme une nouvelle cible thérapeutique majeure, puisqu'elle favorise le comportement agressif des tumeurs, notamment grâce à l'angiogenèse. Le facteur de transcription HIF-1, à la base de cette réponse, nous est apparu comme une molécule de régulation grandement complexe, qui se partage entre le contrôle transcriptionnel, traductionnel, ainsi que le contrôle de la stabilité de la protéine HIF-1 $\alpha$ .

Les kinases IKK et IKK-related forment une famille de kinases aux rôles apparemment non-redondants, en dépit des similitudes de structure flagrantes. Les kinases

IKK $\alpha/\beta$ , induites par des cytokines, des PAMPs et certains stress, modulent l'expression de nombreux gènes, dont ceux impliqués dans l'inflammation, ce qui comprend *CCL2* (MCP-1) et *IL6*, et aussi bien sûr, *HIF1A*. Les kinases TBK1 et IKK-i quant à elles n'ont pas véritablement montré de rôle en dehors des champs de l'immunité innée et du cancer. Certains PAMPs les activent via des récepteurs spécifiques, et mènent à l'activation du facteur de transcription IRF-3, régulateur majeur des IFNs de type I, mais également de quelques ISGs et de chimiokines telles que *CCL5* (RANTES) et *CXCL10* (IP-10). Dans un contexte de tumorigenèse, l'expression de TBK1 et d'IKK-i est augmentée, et le rôle de ces kinases déborde alors de celui de l'immunité innée : on assiste à une activation de voies de survie, qui dépendent entre autres de l'activation de NF- $\kappa$ B, mais aussi, très certainement, d'autres molécules encore non-identifiées.

## 4. Hypothèses, objectifs et méthodologie

Le thème principal de recherche du laboratoire du Dr Marc Servant est l'élucidation des mécanismes moléculaires de l'inflammation et de l'immunité innée. Tel que vu au chapitre 3 de cette introduction, les kinases IKK et IKK-related occupent des rôles majeurs qui semblent non-redondants au sein des voies de signalisation impliquées dans ces processus. Notre étude trouve tout son sens dans le contexte des maladies inflammatoires chroniques, où la persistance d'un agent immunostimulant entraîne une dérégulation de l'homéostasie, ce qui a un impact à long terme sur l'intégrité tissulaire et son fonctionnement. À cet effet, deux thématiques se démarquent de cet ensemble, la signalisation induite par l'AngII, une hormone hypertensive aux effets hypertrophiques et pro-inflammatoires, et la signalisation induite par les pathogènes viraux, dont la résultante déborde de cadre de l'immunité pour fréquenter celui de l'inflammation. L'AngII et le HCMV constituent donc deux agents pro-inflammatoires à l'étude, situés dans le contexte de l'AT, où ils sont tous deux considérés comme des facteurs de risque, l'un en tant que facteur classique, l'autre en tant que facteur émergent, respectivement. La VSMC en culture, décrite à la section 2.3, est un modèle de choix dans nos recherches, puisqu'elle est sensible à l'action de ces 2 agents, et agit en tant que source importante de cytokines en état inflammatoire. Par quels mécanismes ces agents immunostimulants exercent-ils leurs actions ? Est-ce par le biais des kinases IKK et IKK-related ? Est-ce que les facteurs de transcription ciblés directement par ces kinases, NF- $\kappa$ B et IRF-3, ont un rôle-clé dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ? Est-ce que les kinases IKK-related, récemment découvertes, ont des rôles insoupçonnés dans l'inflammation ? C'est dans cette optique de découverte que les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés. Nous allons donc, dans cette section, aborder les fondements de nos hypothèses de recherche et présenter les principales méthodologies utilisées en vue de réaliser nos objectifs de recherche.

## 4.1 Article #1

Le premier article présenté dans cette thèse avait pour objectif de déterminer si les kinases IKK-related TBK1 et IKK-i (sections 3.1 et 3.4) avaient un rôle pro-inflammatoire dans les VSMC en culture infectées par le HCMV. Nous avons illustré le rôle potentiel du HCMV dans l'athérogenèse à la section 2.4.2. Les VSMC, qui représentent un réservoir potentiel de HCMV au sein du tissu vasculaire [1031], sont des cellules permissives au HCMV [1035], et leur infection modifie entre autres leur état prolifératif et migratoire [1041], de même que la prise de lipides [1042]. Il a été montré que le HCMV pouvait induire l'activation de NF- $\kappa$ B dans ces cellules par une voie sensible à la toxine pertussique (Ptx) [1056]. Par ailleurs, il a été montré que le HCMV avait la capacité d'induire l'activation d'IRF-3 dans des fibroblastes [1061], ainsi que d'entraîner la sécrétion de la chimiokine RANTES [1060], une cytokine à la fois régulée par IRF-3 et par NF- $\kappa$ B. Finalement, une étude a montré que l'EGFR était un nouveau récepteur de l'entrée du HCMV [998]. Notre modèle d'étude, pour répondre à notre objectif principal, était les VSMC primaires humaines en culture (HAOSMCs, *human aortic smooth muscle cells*). Nous avons également utilisé une lignée de VSMC de rat Brown Norway (BN) pour répondre à certains objectifs spécifiques. Nous présentons les principaux objectifs de cette étude ainsi que les méthodologies employées au tableau 9, présenté à la page suivante.

Des objectifs connexes découlant de cette première étude ont été formulés suite à la publication de nos résultats en 2005 dans le *Journal of Biological Chemistry*. Il faut situer l'étude dans son contexte : les PRRs impliqués dans la reconnaissance de motifs propres aux virus à ADNdb étaient à l'époque non-caractérisés. Nous présenterons donc à la section 5.1.5 quelques résultats préliminaires obtenus en 2005-2007 qui visaient à identifier les effecteurs en amont de la voie TBK1-IRF-3 suivant une infection au HCMV, puis nous discuterons des découvertes récentes qui concernent l'immunité aux virus à ADNdb (section 6.1.2)



Objectifs spécifiques	Méthodologie
<b>1. Vérifier l'activation de la kinase TBK1 par le HCMV dans des VSMC humaines</b>	Essai kinase <i>in vitro</i> effectué sur des lysats cellulaires de HAOSMCs ayant subi une cinétique infectieuse au HCMV
<b>2. Vérifier le rôle de TBK1 et IKK-i dans l'activation d'IRF-3 par le HCMV</b>	ARN interférence dirigé contre <i>TBK1</i> et/ou <i>IKBKE</i> dans les HAOSMCs. Étude d'IRF-3 par retard sur gel SDS-PAGE, gels natifs (dimérisation) et capacité à lier un élément de réponse ISRE (EMSA).
<b>3. Vérifier le rôle d'IRF-3 dans la transcription de <i>Ccl5</i> (RANTES) et <i>Cxcl10</i> (IP-10) par le HCMV (gènes dépendants d'IRF-3)</b>	Établissement de clones stables de VSMC BN exprimant une version dominante négative d'IRF-3, ΔN-IRF-3 (section 3.3.2), à l'aide de rétrovirus recombinants. RT-PCR pour <i>CCL5</i> et <i>CXCL10</i> suivant une cinétique d'infection au HCMV.
<b>4. Vérifier l'implication d'une voie sensible à PTx dans l'activation d'IRF-3 par le HCMV</b>	Prétraitement des cellules à la PTx 1h avant une cinétique d'infection.
<b>5. Vérifier l'implication de l'EGFR dans l'activation d'IRF-3 par le HCMV</b>	<b>A)</b> Prétraitement à la tyrphostine AG-1478 1h avant une cinétique d'infection. <b>B)</b> Utilisation d'une lignée de VSMC BN surexprimant une version dominante négative de l'EGFR. <b>C)</b> Utilisation d'anticorps neutralisants pour l'EGFR.
<b>6. Étudier le profil de cytokines sécrétées par le HCMV dans les HAOSMCs</b>	Cueillette du surnageant de HAOSMCs infectées en vue d'effectuer des <i>cartesian array</i> (membranes de nitrocellulose couplées à des anticorps dirigés contre des cytokines).

**Tableau 9 : Présentation des objectifs et de la méthodologie de l'article #1.**

## 4.2 Article #2

Le deuxième article présenté dans cette thèse avait pour objectif de déterminer si le complexe IKK était impliqué dans l'activation de NF- $\kappa$ B dans les VSMC stimulées à l'AngII, et si la voie d'activation était classique ou atypique (section 3.2.3). Tel qu'il a été vu à la section 2.4.1.3, certaines études avaient déjà investigué le rôle de NF- $\kappa$ B dans les effets pro-inflammatoires de l'AngII. Rappelons que l'AngII a la capacité d'induire l'expression de cytokines dépendantes de NF- $\kappa$ B dans les VSMC, dont MCP-1 [956] et IL-6 [958]. Le mode d'activation de NF- $\kappa$ B par l'AngII était inconnu à l'époque. Il était cependant clair que la signalisation induite par l'AngII dans les VSMC était complexe (figure 18), et il existait de récentes évidences quant à la transactivation de récepteurs à activité TK, dont l'EGFR, par le récepteur AT1 [881, 884]. Puisqu'il avait été suggéré que la kinase RSK, un substrat de la MAPK ERK [1375], pouvait être impliquée dans l'activation de p65 (section 3.2.4) et sachant que l'EGFR avait la capacité d'induire la voie MEK-ERK ainsi que le voie PI3K-AKT [1376], cette étude avait donc pour objectif de vérifier également si la transactivation de l'EGFR par l'AngII était impliquée dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Nous présentons les principaux objectifs de cette étude ainsi que les méthodologies employées au tableau 10, présenté à la page suivante.

Suite à la publication de cette étude dans le *Journal of Biological Chemistry* en 2006, notre laboratoire a poursuivi l'étude des voies de signalisation en amont du complexe IKK, ce qui culmina en une publication de notre laboratoire en 2010 dans le même journal, et dont nous présenterons les idées directrices dans la discussion de cette thèse (section 6.2.2). Également, nous avons entrepris de vérifier le rôle de la kinase TBK1 dans la signalisation induite par l'AngII dans les VSMC. Nous présentons ces résultats connexes à la section 5.2.5.

Objectifs spécifiques	Méthodologie
<b>1. Vérifier l'activation du complexe IKK par l'AngII dans les VSMC</b>	Essai kinase <i>in vitro</i> à partir de lysats cellulaires de VCMC BN traitées à l'AngII. Immunoprécipitation de IKK $\gamma$ /NEMO pour isoler les kinases IKK $\alpha/\beta$ .
<b>2. Vérifier le rôle de la voie NF-<math>\kappa</math>B dans l'induction de cytokines pro-inflammatoires par l'AngII dans les VSMC</b>	Production de clones de VSMC BN stables exprimant le super-répresseur de NF- $\kappa$ B (section 3.2.1) par infection rétrovirale. RT-PCR pour <i>Ccl2</i> (MCP-1) et <i>Il6</i> (section 1.4.1).
<b>3. Étudier la phosphorylation et la dégradation d'I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math> suivant une stimulation à l'AngII dans les VSMC</b>	<b>A)</b> Immunobuvardage pour la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$ en sérine 32 <b>B)</b> Marquage métabolique au S35 suivi d'une purge ( <i>pulse-chase</i> ) pour l'étude de la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ .
<b>4. Étudier la phosphorylation de p65 lors d'une stimulation à l'AngII de VSMC</b>	<b>A)</b> Marquage métabolique à l'orthophosphate P32 de VSMC stimulées à l'AngII. <b>B)</b> Immunobuvardage pour la phosphorylation de p65 en sérine 536.
<b>5. Vérifier le rôle du complexe IKK dans l'activation NF-<math>\kappa</math>B lors d'une stimulation à l'AngII dans les VSMC</b>	<b>A)</b> Surexpression d'une version dominante négative d'IKK $\beta$ (IKK $\beta$ -K44A, (section 3.1) dans un système hétérologue, soit des HEK 293 avec surexpression d'AT1. <b>B)</b> ARN interférence dirigée contre <i>Ikkkb</i> dans les VSMC BN.
<b>6. Vérifier le rôle de différentes voies de signalisation dans l'activation de NF-<math>\kappa</math>B par l'AngII</b>	Essais inhibiteurs : AG-1478 (activité TK de l'EGFR), U0126 et PD98059 (MEK) et LY294002 (PI3K).

**Tableau 10 : Présentation des objectifs et de la méthodologie de l'article #2.**

### 4.3 Article #3

Finalement, le 3<sup>e</sup> article présenté dans cette thèse avait pour objectif de vérifier le rôle des kinases IKK-related dans l'induction du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  durant un stress hypoxique. Il a été montré que les kinases IKK $\alpha/\beta$  étaient impliquées dans l'induction transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  en normoxie, ce qui a un impact sur la quantité de HIF-1 $\alpha$  induite en hypoxie [539, 540] (voir tableau 5 et section 3.4). Par ailleurs, une étude a montré que la surexpression de TBK1 induisait la sécrétion de facteurs angiogéniques, et que son ARNm était à la hausse dans des tumeurs solides [1373]. Notre hypothèse était donc que cet effet insoupçonné de TBK1 pouvait être dû à la régulation de HIF-1 $\alpha$ . Puisque ce facteur de transcription est régulé de manière complexe (section 1.6.2), nous avons entrepris de vérifier à quel(s) niveau(x) TBK1 pouvait réguler l'induction de HIF-1 $\alpha$ . De plus, puisqu'il avait été montré qu'IKK $\beta$  avait la capacité de phosphoryler TSC1 [1377], nous avons voulu vérifier si TBK1 pouvait également moduler TSC1, étant donné le certain recouvrement de substrats entre ces kinases (figure 24). Rappelons que la voie TSC1-mTOR est modulée par l'hypoxie [1378]. Nos expériences ont été effectuées avec des agents mimétiques de l'hypoxie, tels que le cobalt et la desferrioxamine (DFX), connus pour induire l'expression de HIF-1 $\alpha$  à la manière du stress hypoxique effectué en chambre hypoxique. Nous présentons les principaux objectifs de cette étude ainsi que les méthodologies employées au tableau 11, présenté à la page suivante.

Même si ce 3<sup>e</sup> manuscrit était en préparation lors du dépôt initial de cette thèse, nous y présentons des résultats reproductibles et significatifs. Pourront s'ajouter pour la publication officielle quelques expériences dont la nature pressentie sera abordée dans la discussion de cette thèse (section 6.3).

Objectifs spécifiques	Méthodologie
<b>1. Vérifier le rôle des kinases IKK-related dans l'induction de HIF-1<math>\alpha</math> pendant un stress hypoxique</b>	<b>A)</b> Immunobuvardage pour HIF-1 $\alpha$ dans des MEFs TBK1/IKK-i +/+ et DKO (double KO) en condition hypoxique (CoCl <sub>2</sub> ). <b>B)</b> Reconstitution du phénotype sauvage des MEFs DKO par infection avec des lentivirus recombinant pour flag-TBK1 ou flag-IKK-i. Nécessité de créer une lignée DKO immortalisée (protocole 3T3). <b>C)</b> qPCR pour <i>Vegfa</i> , <i>Slc2a1</i> et <i>Egln1</i> dans les différentes MEFs hypoxiques.
<b>2. Vérifier si TBK1 agit au niveau de la stabilité de la protéine HIF-1<math>\alpha</math> en condition hypoxique</b>	Marquage métabolique à la méthionine-S35 et purge ( <i>pulse-chase</i> ) dans les MEFs (voir ci-haut) hypoxiques en vue d'analyser la stabilité de HIF-1 $\alpha$ par SDS-PAGE.
<b>3. Vérifier si TBK1 agit au niveau de la transcription de HIF-1<math>\alpha</math> en condition hypoxique</b>	<b>A)</b> Prétraitement des cellules avec l'inhibiteur de la transcription actinomycine D avant le stress hypoxique. <b>B)</b> qPCR pour <i>Hif1a</i> dans les différentes MEFs hypoxiques pour vérifier l'induction du message.
<b>4. Vérifier si TBK1 agit au niveau de la traduction de HIF-1<math>\alpha</math></b>	Marquage métabolique (voir point 2) et analyse du HIF-1 $\alpha$ néo-synthétisé en présence ou en absence de TBK1.
<b>5. Vérifier si la surexpression de TBK1 module l'expression de HIF-1<math>\alpha</math></b>	Immunobuvardage pour HIF- $\alpha$ à partir de lysats de HEK 293 ayant subi une co-transfection avec un plasmide encodant pour Flag/Myc-TBK1 et un plasmide encodant pour Flag-HIF-1 $\alpha$ .
<b>6. Déterminer par quel(s) mécanisme(s) TBK1 peut moduler la traduction de HIF-1<math>\alpha</math></b>	<b>A)</b> Immunobuvardage pour la phosphorylation d'acteurs de la traduction : Akt, ERK, RSK et TSC1 dans des cellules hypoxiques en présence ou en absence de TBK1. <b>B)</b> Usage d'inhibiteurs de MEK, PI3K et RSK lors du stress hypoxique.

**Tableau 11 : Présentation des objectifs et de la méthodologie de l'article #3.**

## 5. Articles scientifiques

Nous présentons dans cette section 3 articles scientifiques dans lesquels le candidat Simon-Pierre Gravel a le titre de premier auteur, ou de co-premier auteur, pour sa contribution majeure dans la génération des résultats présentés. Deux de ces articles ont été publiés en 2005 et en 2006 dans le *Journal of Biological Chemistry* (JBC). Un troisième article est en préparation et sera soumis en 2011. L'auteur a également contribué à titre de co-auteur à 2 autres articles publiés qui ne sont pas présentés dans cette thèse. Il est à noter que lors de sa soutenance de thèse, Simon-Pierre Gravel n'abordera pas les résultats de l'article traitant du rôle du complexe IKK dans l'activation de p65 par l'AngII dans les VSMC (JBC, 2006), puisque ces résultats figurent déjà dans le mémoire de maîtrise de madame Annie Douillette, co-première auteure de cette étude, déposé antérieurement. Compte tenu de son implication dans l'étude du complexe IKK et des voies de signalisation de l'AngII, et ce, tout au long de son cheminement au sein du laboratoire de Marc Servant, le candidat a jugé opportun de traiter de ce sujet dans cette thèse. Il présentera également des résultats connexes à cette étude (section 5.2.5). Les articles seront présentés dans l'ordre utilisé dans la section précédente (voir sections 4.1, 4.2 et 4.2). Le format des articles publiés a été modifié, tel que recommandé par le Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat de la Faculté des études supérieures (FES) de l'Université de Montréal, sans toutefois modifier le contenu de ceux-ci, et ce, en vue d'uniformiser la mise en page de cette thèse et d'en faciliter la lecture.

## **5.1 ARTICLE #1**

### **5.1.1 Description du travail effectué par le candidat**

Simon-Pierre Gravel a réalisé toutes les expériences de cette publication et en est donc le premier auteur.

### **5.1.2 Permission de l'éditeur**

**Lors de son deuxième dépôt, le candidat a placé ici une feuille faisant office d'autorisation de l'éditeur.**



### **5.1.3 Accord des coauteurs**

**Lors de son deuxième dépôt, le candidat a placé ici une feuille faisant office d'autorisation des coauteurs.**

#### **5.1.4 Article original**

### **Roles of an IKK-Related Pathway in Human Cytomegalovirus-Infected Vascular Smooth Muscle Cells: A Molecular Link in Pathogens-Induced Proatherosclerotic Conditions**

**Simon-Pierre Gravel and Marc J. Servant**

Faculty of Pharmacy, University of Montreal

Running Title: Proatherosclerotic effects of HCMV through the IKK-related kinases

## Abstract

Viral and bacterial pathogens have long been suspected to directly affect atherogenesis. However, mechanisms linking innate immunity to chronic inflammation diseases such as atherosclerosis are still poorly defined. Here we show that infection of primary human aortic smooth muscle cells (HAOSMC) with human cytomegalovirus (HCMV) leads to activation of the novel IKK-related kinase, Tank Binding Kinase (TBK)-1, a major effector of the cellular innate immune response. We demonstrate that part of HCMV's inflammatory response is most likely mediated via this novel kinase since the canonical IKK complex was only poorly activated upon infection of HAOSMC. Increase in TBK1 phosphotransferase activity led to a strong activation of the Interferon Regulatory Factor (IRF)-3 transcription factor as measured by its C-terminal phosphorylation, dimerization and DNA binding activity. In addition to TBK1, HAOSMC express also another IKK-related kinase isoform –IKK $\epsilon$ – albeit at a lower level. Nevertheless, both isoforms were required for full activation of IRF-3 by HCMV. The transcripts of proatherosclerotic genes *Ccl5* (encoding for the chemokine regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES)) and *Cxcl10* (encoding for the chemokine interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10)), were markedly induced in an IRF-3 dependent manner following HCMV infection of smooth muscle cells. In addition, cytokine arrays analysis showed that RANTES and IP-10 were the predominant chemokines present in the supernatant of HCMV-infected HAOSMC. Activation of the TBK1/IRF-3 pathway was independent of epidermal growth factor receptor and *pertussis toxin*-sensitive G protein-coupled receptors activation. Our results thus add additional molecular clues for a possible role of HCMV as a modulator of atherogenesis through the induction of a proinflammatory response that is, in part, dependent of an IKK-related kinase pathway.

**Key Words:** Atherosclerosis, cytomegalovirus, IRF-3, TBK1, chemokines

## Introduction

Inflammation is a key process in the development of atherosclerosis (AT) and one of the rate-limiting steps in the development of atherosclerotic lesions is the production of inflammatory chemokines by endothelial cells and vascular smooth muscle cells (VSMC) (for review see [1]). The two major chemokine groups are the CC chemokines, which include monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ , and the CXC chemokines interleukin (IL)-8, stromal-cell-derived factor (SDF)-1 $\alpha$  and interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10). Chemokines induce chemotaxis of leukocytes *in vitro* as well as the recruitment of leukocytes to inflammatory sites *in vivo*. These mediators of inflammation have been detected in atherosclerotic lesions from both human and experimental animals but not in normal arteries, suggesting that they may play a significant role in the pathogenesis of AT [2].

Because traditional risk factors such as hyperlipidemia, hypertension, diabetes, age, sex, smoking and familial history cannot explain the occurrence of AT in about 50% of the cases, other factors could be involved [3]. Infectious agents including bacteria such as *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* or viruses such as human cytomegalovirus (HCMV) have long been suspected to initiate or contribute to the disease (see [4, 5] for review). After primary infection, the  $\beta$  herpesvirus HCMV establishes lifelong latent infection in the host. In the human aorta, endothelial cells and VSMC appear to be the primary site of infection, suggesting that the vasculature may serve as a reservoir for HCMV [6]. Infection or reactivation from latency is thought to play an essential role in atherogenesis, both in native AT as well as transplant arteriosclerosis. The molecular mechanisms by which HCMV infection contributes to AT are still not fully understood. The induction of a repertoire of viral genes responsible for cell-cycle control disruption as been suggested [7, 8]. In addition, through upregulation of scavenger receptor (SR)-A and

platelet-derived growth factor (PDGF)-  $\beta$  receptor, HCMV may play a role in cholesterol uptake [9] as well as proliferation and migration of VSMC respectively [10, 11]. Independent studies also demonstrated the production of the cytokines IL-6 and IL-8 in HCMV-infected VSMC [12, 13]. Thus, notably, most of the HCMV infection effects on AT progression seem to be mediated by gene regulation through activation of transcription factors.

The transcription factor NF- $\kappa$ B is an important regulator of inflammation, immune response, and cellular survival [14]. Its role in AT development is strengthened by the observations that it can mediate the induction of more than 150 proatherosclerotic genes [14]. The pathways involved in NF- $\kappa$ B have been well characterized. In nonstimulated cells, the NF- $\kappa$ B factors are retained in the cytoplasm in association with inhibitory subunits - I $\kappa$ Bs. Following viral infection, treatment with proinflammatory stimuli like tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin-1 (IL-1), Lipopolysaccharide (LPS) or exposure to double-stranded RNA (dsRNA), a replicative intermediate of RNA viruses, I $\kappa$ Bs are phosphorylated at conserved N-terminal residues (serines 32 and 36 for I $\kappa$ B $\alpha$ ) by the I $\kappa$ B kinase (IKK) complex, which is composed of two catalytic subunits IKK $\alpha$  and  $\beta$  and one regulatory subunit IKK $\gamma$ . Phosphorylation triggers a signal that induces ubiquitin-dependent degradation of I $\kappa$ Bs, and subsequent nuclear translocation of the NF- $\kappa$ B dimers (for review see [15]). Two related IKK homologs, IKK $\epsilon$  [16], also called IKK-i [17], and TBK1 [18], also called NF- $\kappa$ B-activating kinase (NAK) [19] or tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 2 (TRAF2)-associated kinase (TAK) [20, 21], also have been implicated in NF- $\kappa$ B activation [16, 18, 20-23]. The targets of TBK1 in the NF- $\kappa$ B activation pathway have not been identified, as I $\kappa$ B $\alpha$  does not seem to be the physiological substrate [20]. Other possible substrates of TBK1 include the IKK complex as well as RelA (p65) subunit of NF- $\kappa$ B [19, 21].

Interferon Regulatory Factor (IRF)-3 is another key transcription factor activated following virus infection. It belongs to the family of IRFs, which include IRF-1 to IRF-9 [24]. IRF-3 is essential in the activation of the innate arm of the immune system [25]. The pathways regulating IRF-3 phosphorylation and activation are the focus of considerable investigations. Recent studies suggest that TBK1 and IKK $\epsilon$  correspond to the kinases leading to C-terminal phosphorylation of IRF-3 [26-30]. Upon phosphorylation, IRF-3 homodimerizes and accumulates into the nucleus where it induces gene transcription following recognition of specific DNA response elements called Interferon-stimulated response elements (ISRE) or positive regulatory domains (PRD) I-III located in promoters of chemokines IL-15, IP-10 and RANTES as well as cytokines such as the Type I interferon (IFN) [26, 27] and [31] for a recent review.

As a mechanism of lifelong latent infection, HCMV executes multiple immune-evasive activities in infected cells [32]. Recent reports demonstrated that the tegument protein from HCMV, pp65, was able to prevent NF- $\kappa$ B and IRF-3 activation [33, 34]. Earlier studies also suggested that HCMV infection interferes with the IRF-3 pathway [35, 36]. These reports challenge the concept that HCMV infection of VSMC could lead to AT development through, in part, the induction of proinflammatory genes. This study was thus undertaken to verify if one of the major effector pathway of the innate arm of the immune system, the IKK-related kinase pathway, could be involved in HCMV-induced proinflammatory response in VSMC. Our results show for the first time an inducible phosphotransferase activity of TBK1 by a DNA virus such as HCMV. The activation of the kinase was observed in primary human vascular smooth muscle cells (HAOSMC), was independent of a replication competent virus and led to strong IRF-3 activation followed by the specific and restricted induction of IRF-3 target genes, i.e., the proatherosclerotic chemokines IP-10 (*Cxcl10*) and RANTES (*Ccl5*). IKK $\epsilon$ , albeit expressed at a lower level in primary HAOSMC, was required for full IRF-3 activation by HCMV. Our results thus add additional molecular evidence for a role of HCMV as a modulator of atherogenesis through

the induction of an inflammatory response, which in part, results from the activation of an IKK-related kinase pathway.

## Experimental procedures

### *Reagent, antibodies, and plasmids*

Angiotensin II (Ang II) was purchased from Hubakel Scientific (St. Laurent, QC). Lysophosphatidic acid (LPA) was from Sigma (Oakville, ON). Tyrphostin AG-1478 was from Calbiochem (Mississauga, ON). G418 was from Invitrogen; Pertussis toxin (PTX) was from List Biological Laboratories (Campbell, CA). Commercial antibodies were from the following suppliers: anti-IRF-3 (SC-369X), anti-IKK $\gamma$  (SC-8330), anti-TBK-1 (SC-9911), and anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (SC-371) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti-IKK $\epsilon$  (IMG-270A) (that recognize as well TBK1) was from Imgenex (San Diego, CA); an antibody against the nuclear export sequence of human IRF-3 (anti-NES) was from Immuno-Biological Laboratories Co. (IBL, Japan); anti- $\beta$ -actin clone AC-74 (A5316) was from Sigma (Saint Louis, MO); phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32) antibody (#9241) was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA); a neutralizing antibody against EGFR (clone 05-101) that was recently shown to inhibit HCMV entry [37], was purchased from Upstate Biotechnology; anti-HCMV (a mixture of two mouse monoclonal antibodies against HCMV; M0854) was from DAKO (Denmark). A specific rabbit anti-TBK-1 antibody (89246) that has been shown to immunoprecipitate endogenous TBK1 [27] was a kind gift from Dr. Tom Maniatis (Harvard University, Cambridge, MA). Polyclonal antibodies to ERK1 (SM1), p38 (HSK 591.1), and JNK (914.1) were all gifts from Dr. Sylvain Meloche (University of Montreal, Montreal, Qc) and have been described elsewhere [38]. The anti-phospho-IRF-3 Ser<sup>396</sup> (HIS 5033) was from Dr. John Hiscott (McGill University, Montreal, Qc) and use has described [26, 39]. The IRF-3 dominant-negative mutant ( $\Delta$ NIRF-3) [40]

was a kind gift from Dr. Rongtuan Lin (McGill University, Montreal, Qc). Glutathion-S-transferase (GST)-ATF2 recombinant protein was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). GST-I $\kappa$ B $\alpha$ , GST-IRF-3wt, GST-IRF-3 5A and GST-IRF-3 J2A were kind gifts of Dr. John Hiscott and have been described [26].

#### *Cell types and virus strains.*

Primary human HAOSMC were purchased from Cell Applications, Inc (San Diego, CA) and cultured in medium purchased from the same manufacturer. Each cell lot was from a single donor. All experiments were repeated for 2 different donors. Rat aortic SMC and rat aortic SMC overexpressing a dominant negative version of EGFR (HERCD533) [41] were obtained from Dr. Sylvain Meloche (University of Montreal, Montreal, Qc). Growth conditions, starvation media and stimulation with Ang II and LPA have been described elsewhere [41]. Human foreskin fibroblast (HFF) and MRC-5 fibroblasts were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in minimal essential medium (MEM) containing 10% FBS. All cells tested negative for mycoplasma contamination. HCMV Towne strain was obtained from ATCC. HCMV Toledo was a kind gift of Jeff Vieira (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle). Sendai virus (SeV) was obtained from Specific Pathogen-Free Avian Supply (North Franklin, CT).

#### *HCMV production*

HCMV Towne and Toledo strains were propagated as follows. Subconfluent MRC-5 cells were inoculated with HCMV at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001 plaque forming unit (pfu)/cell for 1 h, with rocking every 15 minutes. After HCMV adsorption, the cells were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) and referred with complete growth medium. Medium was changed each three days until 100% cytopathic effects were observed. 3 to 4 days later, medium was collected and centrifuged at 1500 g for 15 minutes to remove cellular debris. The precleared supernatant was then ultracentrifuged at 154 000



g during 30 minutes at 4°C. The pellet containing concentrated virus particles was washed once with serum free media (SFM) and resuspended in SFM containing 10% glycerol. Aliquots were frozen in liquid nitrogen then stored at –80°C. Virus titers were measured by plaque assays on HFF (passage 4-6) as follows. Cell monolayers were infected with 10-fold serial dilutions of virus stock. Following a 1 hour adsorption period, the cells were overlaid with medium containing 1% methylcellulose (Sigma, Saint Louis, MO). When plaques were seen, approximately 10 to 14 days post infection; the cells were fixed with ice-cold methanol, washed twice with PBS, and then incubated with blocking buffer (6% bovine serum albumin (BSA) in PBS) for 30 min at room temperature. Plaques were detected by immunocytochemical staining with mouse monoclonal anti-HCMV (1/200) as the primary antibody and alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse immunoglobulin G (1/200) for the secondary antibody (KPL, Gaithersburg, MD) followed by enzymatic deposition of BCI/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl/nitro blue tetrazolium; Sigma, Saint Louis, MO). Infectivity was recorded as pfu and habitual titers were approximately  $10^7$  pfu/ml.

### *Infection*

Cells were infected with HCMV Towne strain at a multiplicity of infection (MOI) of 1.0 pfu/cell or with SeV at 40 hemagglutinating units (HAU)/ $10^6$  cells for 2 hours in SFM. Then the SFM was replaced with complete media for the rest of the kinetic. Where indicated, cells were infected with Toledo strain at a MOI of 1.0. In some experiments, before infection, a portion of HCMV stock was heat-treated by boiling for 20 min.

### *RNA interference*

RNA oligonucleotides with 2-nt (2'-deoxy)-thymidine 3' overhangs were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO) and directed against nucleotide: 1612 to 1631 of IKK $\epsilon$  (GAAGCATCCAGCAGATTCA); 1473 to 1492 of TBK1 (GCGGCAGAGTTAGGTGAAA) and a siCONTROL Non-targeting silencing RNA

(siRNA) (#D-001210-01-20) as described previously [26]. For transfection, cells were trypsinized and seeded into six-well plates ( $2.0 \times 10^5$  cells/well) without antibiotics. After 24h, cells were transfected with siRNA using Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications. siRNA were used at a final concentration of 120 nM in transfections. Cells were harvested for analysis 72 h after transfection.

*Retrovector construction, transduction and generation of rat VSMC overexpressing  $\Delta$ NIRF-3*

The pMSCVneo  $\Delta$ NIRF-3 retrovector was generated by amplifying the sequence encoding  $\Delta$ NIRF-3 from the pBSCMV- $\Delta$ NIRF-3 plasmid [42] by PCR (94°C 60 s, 55°C 60 s, 72°C 2 min, for 25 cycles) using Pfx DNA polymerase (Invitrogen) with the following primers: 5'-ACGTGAATTCATGGGAACCCCAAAGCCACGG-3' and 5'-TCGAGAGCTCAGCAGGAACCAGTT-3'. The cloning product was verified by sequencing, cleaved with *Eco*RI and *Xho*I (*Eco*RI and *Xho*I restriction sites were inserted within the primers) and cloned into pMSCVneo retrovector (Clontech), cut with the same enzymes. The Phoenix Amphotropic packaging cell line was transiently transfected as described ([www.stanford.edu/group/nolan/phxhelper.html](http://www.stanford.edu/group/nolan/phxhelper.html)) with the plasmids pMSCVneo and pMSCVneo  $\Delta$ NIRF-3. At 48 h post-transfection, retrovirus-containing medium was harvested and used to infect rat VSMC. VSMC were infected twice at 24 h intervals in the presence of 10 µg/ml of polybrene (Sigma); selection with 800 µg/ml of G418 (GIBCO) was started 5 days later. After 14 days, a population of resistant VSMC was selected. For selection of clones from both rat VSMC (Neo) and rat VSMC ( $\Delta$ NIRF-3), cloning rings were used and expression of the transgene was verified by immunoblot analysis.

### *RT-PCR analysis*

Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen). DNase-treated (Ambion, Austin, TX) cellular RNA (1 µg) was reverse transcribed with AMV reverse transcriptase (Sigma) in a 20 µl reaction volume according to manufacturer's instructions. PCRs were subsequently performed per the manufacturer's specifications with the following primers: rat RANTES forward and reverse, 5'-CTGCAGCTGCATCCCTCACC-3' and 5'-CCACTTCTTCTCTGGGTGG -3' respectively; rat  $\beta$ -actin forward and reverse, 5'-CCATGTACGTAGCCATCCA -3' and 5'-GATAGAGCCACCAATCCAC-3' respectively; human RANTES forward and reverse, 5'-ATGAAGGTCTCCGCGGCAGC-3' and 5'-AACCCATTTCTTCTCTGGGT-3' respectively; rat IP-10 has been described [43] as well as human IP-10 [44] and human  $\beta$ -actin [45].

### *Immunoblot analysis and Native-PAGE*

Preparation of whole cell extracts (WCE) and analysis of IRF-3, TBK1, IKK $\epsilon$  and I $\kappa$ B $\alpha$  by immunoblot analysis were accomplished as described previously [39, 46]. Both anti-NES (IBL) and anti-TBK1 (Santa Cruz) were used at 1 µg/ml. Anti-I $\kappa$ B $\alpha$  and anti-IKK $\epsilon$  were used at 2 µg/ml, anti- $\beta$ -actin was used at 1/10000 and phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32) antibody was used following manufacturer's instructions. Native-PAGE were conducted as described [47]. Briefly, 7.5% acrylamide gels (without SDS) were pre-run with 25 mM Tris and 192 mM Glycine, pH 8.4 with and without 1% deoxycholate (DOC) in the cathode and anode chamber, respectively, for 30 min, at 40 mA. WCE (15 µg) diluted in native sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 15% glycerol and bromophenol blue) were applied to the gel and subjected to electrophoresis for 60 min. at 25 mA. Immunoblotting was performed as above using the anti-NES antibody.

### *In vitro kinase assays*

The phosphotransferase activity of ERK1, JNK and p38 was measured by specific immune complex kinase assays using myelin basic protein (MBP), GST-c-Jun and GST-ATF2 recombinant proteins as substrates respectively [38]. To verify the phosphotransferase activity of TBK1 and the IKK complex, 100 to 250 µg of WCE were incubated for 4 hours at 4°C with specific antibodies: anti-IKK $\gamma$  (SC-8330) for IKK complex and anti-TBK1 (89246) preadsorbed to protein-A-sepharose beads. The immune complexes were washed three times with lysis buffer and once with kinase buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, and 2 mM dithiothreitol (DTT)). TBK1 and IKK complex activities were assayed by resuspending the beads in 40 µl of kinase buffer containing 1 µg of GST-IRF-3 or GST-IkB $\alpha$  respectively, 20 µM ATP, and 20 µCi of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. The reactions were incubated at 30°C for 30 min. and stopped by the addition of 2X Laemmli's sample buffer. The samples were analyzed by SDS-gel electrophoresis. Following Coomassie staining, the gels were dried and exposed to a Gel Documentation device (Typhoon scanner 9410, Amersham) for imaging and quantification. In some experiments, the upper part of the gel was electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes and immunoprecipitated TBK1 was revealed by immunoblotting using anti-TBK1 antibody (SC-9911).

### *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)*

For electrophoretic mobility shift assay (EMSA), WCE (15 µg) were incubated at 15°C for 5 min. in a buffer containing 20 mM HEPES pH 7.0, 40 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM NaF, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 4% (vol/vol) Ficoll, 0.08% (vol/vol) Triton X-100, 2 µg of poly(dI)-poly(dC), and approximately 0.1 ng of <sup>32</sup>P-5'-end-labeled oligonucleotide in a final volume of 25 µl. 1 µl of an anti-IRF-3 antibody (SC-369X) was included in some experiments for 15 min. at 4°C before the addition of the radiolabeled oligonucleotides. Reactions were resolved using a 6% acrylamide-0.2% N,N'-

methylenebisacrylamide polyacrylamide gel. Following electrophoresis the gels were dried and exposed to a Typhoon scanner 9410 for imaging and quantification. Double-stranded oligonucleotides representing the ISG15 ISRE sequence and a mutated ISRE version have been described [35].

#### *Cartesian Arrays*

A Cartesian Array kit (BioSource, Camarillo, CA) was used for *in vitro* detection of cytokines released in culture medium. The assay recognizes both natural and recombinant human cytokines. Supernatants were diluted 3 times in dilution buffer before immunoblotting with the membrane arrays. Blotting and detection were accomplished as described by the manufacturer's instructions.

## Results

### *Activation of Tank binding kinase 1 in primary HAOSMC infected with HCMV*

Infections of fibroblasts with HCMV have been shown to activate multiple kinases including PI3-kinase-AKT pathway [48] and mitogen-activated protein (MAP) kinases pathways, i.e., p38 and ERK [49-51]. Using *in vitro* kinase assays, we also observed ERK, JNK, and p38 activation in primary HAOSMC infected with HCMV (Figure 1). Recent studies have described the role(s) of the noncanonical IKK-related kinases TBK1 and IKK $\epsilon$  as essential components of an IRF-3 signaling pathway activated by enveloped RNA viruses or Toll-like receptor (TLR)-3 and -4 engagement by dsRNA and LPS respectively [26, 27, 29, 30]. Since TBK1 is constitutively and ubiquitously expressed as opposed to IKK $\epsilon$  (see [17, 19] and Fig. 6A) we first wanted to verify if the activity of TBK1 was increased in HCMV-infected HAOSMC. Figure 2A shows that HCMV infection of HAOSMC strongly activated TBK1 phosphotransferase activity as measured by phosphorylation of the C-terminal region of IRF-3. The phosphotransferase activity started at 4 hours post infection (hpi) and was sustained for 16 hpi. Under our experimental conditions, IKK $\epsilon$  was not detected in TBK1-immune complexes (data not shown). In order to delineate which Ser/Thr residues of IRF-3 were phosphorylated by TBK1, *in vitro* kinase assays were accomplished with different GST-IRF-3 recombinant proteins. Fig. 2B shows that major phosphoacceptor sites targeted by TBK1 *in vitro* mapped to the second clustered Ser/Thr residues (see Fig. 2B and C), an acidic region known to be involved in IRF-3 activation [31]. We also addressed the level of activation of the canonical IKK complex following infection of primary HAOSMC with HCMV. Figure 3A shows that TBK1 phosphotransferase activity was again strongly activated by HCMV and, to a lesser extend, the enveloped RNA virus Sendai virus (SeV) used as a positive control (compare lanes 4-5 and 8-9). When the same cellular extracts were used to verify the phosphotransferase activity of the IKK complex, a significant increase was observed when cells were infected with SeV (Fig. 3B, lanes 1-5). However, no activation of the IKK

complex was detected in HCMV-infected HAOSMC in the first hours following the infection (Fig. 3B, lanes 6-9). Intriguingly, other studies have shown activation of the NF- $\kappa$ B pathway in human SMC infected by HCMV [50, 52]. Since degradation of the NF- $\kappa$ B inhibitor-I $\kappa$ B $\alpha$  is often used as a hallmark of the activation of the NF- $\kappa$ B pathway, we decided to verify the expression level of the latter in our model. In a reproducible manner, another set of experiment showed no detectable phosphotransferase activity of the IKK complex as opposed to a significant activation of TBK1 at 4 hpi (Fig. 3C, compare panels *a* and *b*, lanes 4-6). Importantly, the inability of HCMV to induce the activation of the IKK complex correlated with a lack of *in vivo* phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  on Ser 32 (Fig. 3C, panel *c*). Nevertheless, the expression level of I $\kappa$ B $\alpha$  was significantly reduced upon virus infection (Fig. 3C, panel *d*). The apparent lack of IKK complex activation following HCMV infection could have been due to a poor sensitivity of our *in vitro* kinase assay. However, following infection of HAOSMC with SeV, specific phosphoserine 32 signal of endogenous I $\kappa$ B $\alpha$  followed the same kinetic of activation of the IKK complex (Fig. 3D). Moreover, quantitative analysis revealed that the phosphotransferase activity of the IKK complex was increased up to 13 fold following SeV infection (Fig. 3D) and 20 fold after a 5 min. exposition of the cells to TNF- $\alpha$  (data not shown). Collectively, these data suggest that HCMV has the capability to induce the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . Importantly however, this seems to occur in an IKK-independent mechanism. Since the phosphotransferase activity of TBK1 was strongly induced in HCMV-infected cells, these findings suggest that TBK1 might play a more important role than the canonical IKK complex in HCMV pathogenicity. They also suggest that IRF-3 is likely activated *in vivo* by HCMV in primary HAOSMC.

### ***Activation of IRF-3 by HCMV***

Through biochemical evidences such as DNA binding activity and nuclear accumulation, previous reports have suggested the activation of IRF-3 in fibroblasts infected with HCMV [35, 36]. However, these reports suggested a possible viral-induced protein with antagonistic activity towards IRF-3 because activation of the latter was partly or totally

dependent of the presence of cycloheximide. Viral interference with the IRF-3 pathway might be dependent on the presence of HCMV's tegument protein pp65 since it was recently proposed to block phosphorylation and nuclear accumulation of IRF-3 [34]. Given that we observed a significant increase in the phosphotransferase activity of the TBK1 in primary HAOSMC following HCMV infection (Figs. 2 and 3), we wanted to revisit the possibility that IRF-3 is activated in response to HCMV. We first assessed the phosphorylation status of IRF-3 in response to HCMV by SDS-PAGE and Western blot analysis. Activation of IRF-3 following its C-terminal phosphorylation was relatively easy to detect in extracts from HCMV infected cells, since phosphorylated IRF-3 migrates with a higher apparent MW in SDS-PAGE than non-phosphorylated IRF-3 [39, 42, 46] (Fig. 4A compare lanes 1-2 with lanes 3 to 5). The serine (Ser) 396 phosphorylation has previously been characterized as the minimal phosphoacceptor site required for RNA virus-mediated IRF-3 activation in vivo [26, 39]. Figures 4A and 4B show that there was a clear temporal correlation between the detection of the phosphoserine 396 signal and the appearance of the higher MW phosphorylated IRF-3 species. Thus, these data demonstrate that Ser 396 phosphorylation of IRF-3 occurs in vivo following infection with HCMV. Similar data were observed with the clinical isolate Toledo (data not shown).

Previous studies have suggested that C-terminal phosphorylation of IRF-3 alters its conformation and induces its dimerization [47, 53]. Using a native gel assay [47], our data show that HCMV-induced C-terminal phosphorylation of IRF-3 is followed by dimer formation (fig. 4C, lanes 3-5). It is important to note that C-terminal phosphorylation and dimerization of IRF-3 followed the same kinetic of TBK1 activation, i.e., activation of both proteins was observed 4 hpi (compare Fig. 2A, lane 6 and Fig. 3A, lane 8 with Fig. 4A, lane 3). It is thought that the dimerization of IRF-3 is followed by its nuclear accumulation, its binding to specific promoters and the induction of antiviral set of genes [53, 54]. Indeed, evidence in increase DNA binding activity of IRF-3 was observed by EMSA using extracts prepared after infection with HCMV in the presence or absence of cycloheximide (Fig. 5A,



lanes 3-5 and 8-10). A polyclonal antibody specific for IRF-3 included in the binding reaction specifically inhibited the formation of the complex (Fig. 5A lanes 11 and 12). Figure 5B shows the specificity of the binding signal in EMSA. An excess of homologous oligonucleotide inhibited complex formation by extracts of HCMV-infected primary HAOSMC (Fig 5B, lanes 5 and 11) whereas an excess of a derivative oligonucleotide containing a single point mutation had no detectable effect (Fig. 5B lanes 6 and 12). Even if the TBK1/IRF-3 pathway was strongly activated by HCMV in primary HAOSMC, we did observed a weak but significant effect of cycloheximide in these primary cells (Figs. 4B and 5A, compare lanes 3 to 5 with lanes 8 to 10). Given that LPS is a well-characterized inducer of IRF-3 [27-30], there was the possibility that our observations were caused by contamination of the viral stock with minute quantities of endotoxin. To exclude this possibility, we heat-treated our HCMV preparation. Indeed, LPS exhibit thermostability [55] while most proteins are thermolabile. Heat treatment of our HCMV preparation completely blocked its ability to activate IRF-3 in primary HAOSMC. Moreover, LPS alone failed to induce IRF-3 under our experimental conditions (data not shown). Together these experiments, while partly confirming previous observations, nevertheless clearly demonstrate that HCMV has the intrinsic capability of activating the TBK1/IRF-3 pathway in permissive primary HAOSMC.

***Both IKK-related kinases are required for full activation of IRF-3 in HCMV-infected primary HAOSMC***

In addition to TBK1, IKK $\epsilon$  is known to be part of the signaling cascade leading to IRF-3 activation [26-30]. However, IKK $\epsilon$  is predominantly expressed in immune cells and tissues, including peripheral blood leukocytes, spleen, and thymus [17]. On the other hand, TBK1 is constitutively and ubiquitously expressed [19]. Indeed, using an antibody that recognize both isoforms, we observed that the expression level of IKK $\epsilon$  was weak in primary HAOSMC as oppose to the U937 monocytic cell line used as a positive control (see Fig. 6A). However, TBK1 was equally expressed in both cell models. Albeit this differential

profile in their respective distribution, we decided to verify the contribution of these two isoforms in IRF-3 activation by using RNA silencing (siRNA) technology. Upon transfection of the indicated siRNA duplexes, the expression levels of both isoforms were down regulated by 60 to 70% (see Fig. 6B and C). When the isoforms were individually down regulated, a net decrease (~50%) in HCMV-induced IRF-3 dimerization was observed (Fig. 6D, compare lane 2 with lanes 4 and 6). However, under conditions where both isoforms were knocked down, HCMV-induced IRF-3 dimerization was almost completely abrogated (see Fig. 6D, lanes 7-8). These data thus demonstrate that both kinases are required for full activation of IRF-3 in HAOSMC infected with HCMV.

***HCMV infection of vascular smooth muscle cells results in the induction of proatherosclerotic genes in an IRF-3 dependent manner***

Chemokines are thought to play a major role in AT development. Since the genes *Cxcl10* (encoding for the chemokine IP-10) and *Ccl5* (encoding for the chemokine RANTES) contain ISRE elements in their promoters and that their transcription is induced by IRF family members such as IRF-3 [40, 56], we addressed whether these genes were induced in an IRF-3-dependent fashion in primary HAOSMC and rat VSMC infected by HCMV. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that both *Ccl5* and *Cxcl10* transcripts were induced by HCMV (Fig. 7A). This increase in these proatherogenic transcripts was followed by the detection of their related proteins in the supernatant of HCMV-infected HAOSMC (Fig. 7B). Remarkably, only IP-10, RANTES and IL-6 were significantly increase in the supernatant of HAOSMC at 20 hpi. Activation of TBK1/IRF-3 pathway was also observed in HCMV-infected rat VSMC (see Fig. 9F and data not shown). These cells were therefore used as a model for stable expression of a dominant-negative mutant of IRF-3 ( $\Delta$ NIRF-3) [40]. Different clones were isolated, amplified and characterized (Fig. 8A). Following HCMV infection, induction of transcripts for both *Ccl5* and *Cxcl10* was observed in the two clones of rat VSMC expressing only the neomycin cassette (clones neo #3 and #6; Fig. 8B and C). However, the presence of high level of  $\Delta$ NIRF-3 in clone #3.3

markedly attenuated the induction of both *Ccl5* and *Cxcl10* mRNA by HCMV (Fig. 8B and C). The clone expressing moderate level of  $\Delta$ IRF-3 (clone#8.3) displayed only intermediate levels of induction of these transcripts. Together, these data clearly demonstrate that HCMV infection of vascular cells results in the production of proatherosclerotic chemokines in an IRF-3 dependent manner.

***Activation of the TBK1/IRF-3 pathway by HCMV is independent of Pertussis toxin-sensitive G $\alpha$ i/o proteins and signaling through epidermal growth factor receptor (EGFR)***

Studies have shown that binding of HCMV's glycoprotein to host cell receptors activates cellular signaling pathways and cytokines production (for review see [57]). This was specifically demonstrated for the envelope glycoprotein B (gB) of HCMV, which alone was recently shown to induce IRF-3 activation in the presence of cycloheximide [58]. Interestingly, gB interacts, induces intracellular signaling and allows viral entry through at least one type of host receptor, i.e., the EGFR [37]. In addition, *pertussis toxin* (PTX)-sensitive G proteins are involved in HCMV-induced activation of ERK, cPLA2 and NF- $\kappa$ B in primary HAOSMC [50] and IL-6 production in fibroblasts [59]. In light of these interesting findings, we thought to verify the involvement of these pathways in TBK1/IRF-3 activation by HCMV in HAOSMC as well as rat VSMC. As previously reported [41], treatment of rat VSMC with PTX, a potent inhibitor of G $\alpha$ i/o proteins [50], totally blocked lysophosphatidic acid (LPA)-induced ERK1 activation (Fig. 9A, lane 8). Pretreatment with the tyrphostin AG-1478, a selective EGFR kinase inhibitor that effectively blocks HCMV-induced intracellular signaling and viral entry [37], inhibited the activation of ERK1 by both Ang II and LPA (Fig. 9A, lanes 6 and 9) as reported [41]. However, in the presence of these inhibitors, IRF-3 was still activated by HCMV in HAOSMC when verified by a decrease of mobility in SDS-gel, the use of the phosphospecific antibody, the dimerization state and the DNA binding activity of IRF-3 (Fig. 9, panels B to E). These observations correlated with an activation of the phosphotransferase activity of TBK1 in rat VSMC overexpressing a dominant negative version of EGFR (HERCD533) [41] (Fig. 9F) and the

failure of PTX and AG-1478 to inhibit HCMV-induced TBK1 activation in human primary HAOSMC (Fig. 9G).

## Discussion

### *Production of proatherogenic chemokines by HCMV is, in part, mediated through the activation of an IKK-related pathway in primary HAOSMC*

The innate immune response and the process of inflammation are interconnected (for review see [60]). Excessive and continuing cytokine production in response to pathogens is thought to induce the development of an inflammation response leading to pathological conditions such as AT [61]. In addition to its effect on the cell cycle and apoptosis, VSMC migration, proliferation and cholesterol uptake, we show here that infection of primary HAOSMC with HCMV induces strong production of RANTES and IP-10 chemokines in an IKK-related kinases/IRF-3 dependent manner. HCMV infection of HAOSMC also induces a marked degradation of the NF- $\kappa$ B inhibitor, I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 3C, panel *d*), thus suggesting activation of the NF- $\kappa$ B pathway in HCMV-infected HAOSMC as also reported by others [50, 52]. In this scenario, we propose that activation of NF- $\kappa$ B is most likely in part responsible for the presence of IL-6, a known NF- $\kappa$ B regulated gene, in the supernatant of HCMV-infected HAOSMC (Fig. 7). Since the canonical IKK complex was only poorly activated (depending on the lot of primary HAOSMC, a very weak increase in the phosphotransferase activity (1.5 folds) of the IKK complex was sometime detected), it is unlikely that it is involved in HCMV-mediated I $\kappa$ B $\alpha$  degradation. Indeed, phosphorylation on Ser 32 of I $\kappa$ B $\alpha$  was not observed during the time course studied (Fig. 3C, panel *c*). We therefore propose that other intracellular pathways must be activated by HCMV and involved in I $\kappa$ B $\alpha$  degradation. On the other hand, since the IKK-related kinase TBK1 was significantly activated by HCMV, it could also have an effect on the induction of NF- $\kappa$ B-targeted genes through phosphorylation of p65 subunit of NF- $\kappa$ B on Ser536 [21] thus influencing the recruitment of the basal transcriptional machinery [62]. We have initiated the characterization of the pathways activated following HCMV infection of HAOSMC and leading to I $\kappa$ B $\alpha$  degradation as well as p65 phosphorylation. We do not have results

explaining the weak induction of the IKK complex by HCMV in primary HAOSMC but one can argue that it might be, in part, related to the presence of HCMV's tegument protein pp65 [33].

RANTES has been implicated in cardiac inflammatory disorders after organ transplantation or arterial injury [63, 64]. RANTES has also been detected in plasma samples from patients suffering from cardiovascular diseases [65] and, more recently, a study showed a reduction of atherosclerotic plaque formation in mice treated with a RANTES receptor antagonist [66]. IP-10, like RANTES, is a chemoattractant for monocytes and lymphocytes. Its levels are increased in the carotid artery of rats after angioplasty [43] and it is also found in human atheroma-associated cells such as endothelial cells, VSMC and macrophages [67]. More recently, the plasma concentrations of IP-10 were shown to be increased in patient suffering from restenosis following percutaneous transluminal coronary angioplasty [68] and acute mouse cytomegalovirus infection increased aortic induction of the *Cxcl10* gene in young apoE<sup>-/-</sup> and C57BL/6J mice [69]. Collectively, our results are compatible with the hypothesis that HCMV infection of vascular cells, such as primary HAOSMC, might play a pivotal role in atherosclerotic disease. In addition, our study directly addresses the molecular mechanism involved in HCMV-induced proatherogenic genes induction in primary HAOSMC. This is the first report demonstrating direct activation of a novel effector of the innate immune response -TBK1- by a DNA virus such as HCMV. So far, only enveloped RNA viruses, dsRNA and LPS, have been shown to use this novel pathway to activate IRF-3 [26, 27, 29, 30]. By verifying important steps of IRF-3 activation (C-terminal phosphorylation, dimerization, and DNA binding activity), we clearly demonstrate that HCMV has the intrinsic capability to activate IRF-3 in human HAOSMC. We were not able to directly verify the phosphotransferase activity of the other IKK-related isoform -IKK $\epsilon$ - because we did not find antibodies that were able to form active in vitro immunocomplexes (data not shown). However, despite the weak expression of this isoform (as opposed to TBK1, see Fig. 6A), the use of siRNA technology allowed us to demonstrate

that both kinases are required for full activation of IRF-3 in HAOSMC infected with HCMV.

We observed a weak but significant viral interference with IRF-3 activation in HAOSMC since cycloheximide treatment resulted in stronger IRF-3 activation (see Figs. 4 and 5). Similar observation was made in HCMV-infected human foreskin fibroblasts [35]. Contrary to these observations, infection of human fetal lung (HFL) fibroblasts with HCMV resulted in the activation of IRF-3 only in the presence of cycloheximide [35]. We do not have any explanation for this discrepancy but it seems likely to be cell type related. In addition to this observation, we did not address the direct effects of HCMV's tegument protein pp65 on IRF-3 activity. The results demonstrating that pp65 inhibited IRF-3 phosphorylation and nuclear accumulation [34] might suggest that only upon infection at high MOI (i.e. when several pp65 molecules are delivered to the infected cell) would HCMV's tegument protein inhibit the activation of IRF-3.

### ***Signaling pathways leading to TBK1/IRF-3 pathway activation by HCMV in VSMC***

Transcriptionally inactive HCMV induces the activation of the innate arm of the immune system as well as cytokine production [70, 71]. These observations suggest that structural components of the virion, such as gB from HCMV, could probably initiate these responses through activation of cell surface receptors on the host cells [51, 72]. Accordingly, Wang et al. demonstrated that EGFR was involved in HCMV-induced signaling and viral entry and, moreover, that gB was a ligand of EGFR [37]. In addition, Compton's group showed that IRF-3 was activated by recombinant gB in the presence of cycloheximide [58]. In our model system, however, it is unlikely that EGFR-signaling contributes to TBK1/IRF-3 activation. The use of a highly characterized EGFR tyrosine kinase inhibitor (AG-1478) did not affect IRF-3 activation by HCMV and, importantly, the phosphotransferase activity of TBK1 was even stronger in VSMC expressing a dominant negative version of EGFR (see

Fig 9F). Another scenario suggests that EGFR could be used for docking of virions on the host cells prior to receptor clustering and activation of the innate immunity [73]. However, we did not observe a significant reduction in the activation of IRF-3 when using a neutralizing antibody against EGFR that inhibits viral entry (data not shown) [37]. A similar conclusion was reached with the use of the tyrphostin AG-1478, which was also shown to inhibit HCMV entry in target cells [37]. Since hematopoietic cells do not express EGFR but are efficiently infected by HCMV [74], the existence of other HCMV receptors, or other gB receptors in addition to EGFR is to consider. Indeed, while this manuscript was under revision, Compton's group showed that integrins are likely to play a key role in HCMV entry [75]. The involvement of Gai/o-coupled GPCR is also unlikely since PTX treatment had no antagonistic effect on the intracellular pathways leading to IRF-3 activation in HAOSMC.

TLRs are major key players in pathogen recognition (for reviews see [76, 77]). A recent study demonstrated that the induction of inflammatory cytokines by HCMV was mediated via a TLR2-dependent activation of NF- $\kappa$ B [78]. However, this study did not verify whether IRF-3 was activated in a TLR2-dependent fashion by HCMV. So far, data in the literature suggest that this is unlikely since of the ten human TLR members published to date, only TLR3 and 4 have been shown to induce type I IFNs production through IRF-3 activation (for review see [79]). Thus, experiments are underway to try to identify other HCMV receptors or gB receptors that are responsible for the activation of the innate arm of the immune response through the TBK1/IRF-3 pathway.

Recently Tontonoz's group demonstrated a crosstalk between LXR and TLR signaling mediated by IRF-3, the latter acting as an antagonist of cholesterol metabolism through its affect on the ABCA1 transporter [80]. Our discovery of a functional link between activation of TBK1 and IRF-3 in HCMV-infected smooth muscle cells and the work from Tontonoz's group extend our knowledge on the possible role of IRF-3 in atherogenesis.



More work is still necessary in order to appreciate the complex response of host cells to virus infection and more precisely how HCMV modulates atherogenesis.

## **Acknowledgments**

We thank Drs. John Hiscott, Sylvain Meloche, Tom Maniatis, Rongtuan Lin and Jeff Vieira for reagents used in this study. We thank also to Drs. Pierre Moreau, Huy Ong, Sylvie Laquerre and Guy Servant for helpful discussions.

## References

1. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. 420(6917): p. 868-74.
2. Wang, J.M., et al., *Chemokines, receptors, and their role in cardiovascular pathology*. Int. J. Clin. Lab. Res., 1998. 28: p. 83-90.
3. Nieminen, M.S., K. Mattila, and V. Valtonen, *Infection and inflammation as risk factors for myocardial infarction*. Eur Heart J, 1993. 14 Suppl K: p. 12-6.
4. Kuvin, J.T. and C.D. Kimmelstiel, *Infectious causes of atherosclerosis*. Am Heart J, 1999. 137(2): p. 216-26.
5. Streblow, D.N., S.L. Orloff, and J.A. Nelson, *Do pathogens accelerate atherosclerosis?* J Nutr, 2001. 131(10): p. 2798S-2804S.
6. Pampou, S., et al., *Cytomegalovirus genome and the immediate-early antigen in cells of different layers of human aorta*. Virchows Arch, 2000. 436(6): p. 539-52.
7. Speir, E., et al., *Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis*. Science, 1994. 265(5170): p. 391-4.
8. Murphy, E.A., et al., *The human cytomegalovirus IE86 protein can block cell cycle progression after inducing transition into the S phase of permissive cells*. J Virol, 2000. 74(15): p. 7108-18.
9. Zhou, Y.F., et al., *Human cytomegalovirus increases modified low density lipoprotein uptake and scavenger receptor mRNA expression in vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1996. 98(9): p. 2129-38.
10. Streblow, D.N., et al., *The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration*. Cell, 1999. 99(5): p. 511-20.
11. Zhou, Y.F., et al., *The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta-receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 256(3): p. 608-13.
12. Dhaunsi, G.S., J. Kaur, and R.B. Turner, *Role of NADPH oxidase in cytomegalovirus-induced proliferation of human coronary artery smooth muscle cells*. J Biomed Sci, 2003. 10(5): p. 505-9.

13. Arkonac, B., et al., *Low multiplicity cytomegalovirus infection of human aortic smooth muscle cells increases levels of major histocompatibility complex class I antigens and induces a proinflammatory cytokine milieu in the absence of cytopathology*. J Heart Lung Transplant, 1997. 16(10): p. 1035-45.
14. Collins, T. and M.I. Cybulsky, *NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?* The Journal of Clinical Investigation, 2001. 107: p. 255-264.
15. Karin, M., Y. Yamamoto, and Q.M. Wang, *The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2004. 3(1): p. 17-26.
16. Peters, R., S.M. Liao, and T. Maniatis, *IKKe is part of a novel PMA-inducible Ikb kinase complex*. Molecular Cell, 2000. 5: p. 513-522.
17. Shimada, T., et al., *IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases*. Int Immunol, 1999. 11(8): p. 1357-62.
18. Pomerantz, J.L. and D. Baltimore, *NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase*. Embo J, 1999. 18(23): p. 6694-704.
19. Tojima, Y., et al., *NAK is an IkappaB kinase-activating kinase*. Nature, 2000. 404(6779): p. 778-82.
20. Bonnard, M., et al., *Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription*. Embo J, 2000. 19(18): p. 4976-85.
21. Fujita, F., et al., *Identification of NAPI, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling*. Mol Cell Biol, 2003. 23(21): p. 7780-93.
22. Peters, R.T. and T. Maniatis, *A new family of IKK-related kinases may function as Ikappa B kinase kinases*. Biochim Biophys Acta, 2001. 1471(2): p. M57-62.
23. Nomura, F., et al., *NF-kappaB activation through IKK-i-dependent I-TRAF/TANK phosphorylation*. Genes Cells, 2000. 5(3): p. 191-202.
24. Mamane, Y., et al., *Interferon regulatory factors: the next generation*. Gene, 1999. 237(1): p. 1-14.
25. Sato, M., et al., *Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction*. Immunity, 2000. 13(4): p. 539-48.

26. Sharma, S., et al., *Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway*. Science, 2003. 300(5622): p. 1148-51.
27. Fitzgerald, K.A., et al., *IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway*. Nat Immunol, 2003. 4(5): p. 491-6.
28. McWhirter, S.M., et al., *IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(1): p. 233-8.
29. Hemmi, H., et al., *The Roles of Two IkappaB Kinase-related Kinases in Lipopolysaccharide and Double Stranded RNA Signaling and Viral Infection*. J Exp Med, 2004. 199(12): p. 1641-50.
30. Perry, A.K., et al., *Differential Requirement for TANK-binding Kinase-1 in Type I Interferon Responses to Toll-like Receptor Activation and Viral Infection*. J Exp Med, 2004. 199(12): p. 1651-8.
31. Hiscott, J., et al., *Convergence of the NF-kappaB and interferon signaling pathways in the regulation of antiviral defense and apoptosis*. Ann N Y Acad Sci, 2003. 1010: p. 237-48.
32. Gutermann, A., et al., *Strategies for the identification and analysis of viral immune-evasive genes--cytomegalovirus as an example*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. 269: p. 1-22.
33. Browne, E.P. and T. Shenk, *Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(20): p. 11439-44.
34. Abate, D.A., S. Watanabe, and E.S. Mocarski, *Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response*. J Virol, 2004. 78(20): p. 10995-11006.
35. Preston, C.M., A.N. Harman, and M.J. Nicholl, *Activation of interferon response factor-3 in human cells infected with herpes simplex virus type 1 or human cytomegalovirus*. J Virol, 2001. 75(19): p. 8909-16.
36. Navarro, L., et al., *Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex*. Molecular and Cellular Biology, 1998. 18: p. 3796-3802.
37. Wang, X., et al., *Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus*. Nature, 2003. 424(6947): p. 456-61.

38. Giasson, E., M.J. Servant, and S. Meloche, *Cyclic AMP-mediated inhibition of angiotensin II-induced protein synthesis is associated with suppression of tyrosine phosphorylation signaling in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1997. 272(43): p. 26879-86.
39. Servant, M.J., et al., *Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA*. J Biol Chem, 2003. 278(11): p. 9441-7.
40. Lin, R., et al., *Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription*. Mol Cell Biol, 1999. 19(2): p. 959-66.
41. Voisin, L., et al., *EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. 283(2): p. C446-55.
42. Lin, R., et al., *Virus dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential and proteasome mediated degradation*. Molecular and Cellular Biology, 1998. 18: p. 2986-2996.
43. Wang, X., et al., *Interferon-inducible protein-10 involves vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and inflammatory response*. J. Biol. Chem., 1996. 271: p. 24286-24291.
44. Setsuda, J., et al., *Interleukin-18, interferon-gamma, IP-10, and Mig expression in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis and posttransplant lymphoproliferative disease*. Am J Pathol, 1999. 155(1): p. 257-65.
45. Dasu, M.R., et al., *Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts*. Burns, 2003. 29(6): p. 527-31.
46. Servant, M.J., et al., *Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3*. J Biol Chem, 2001. 276(1): p. 355-63.
47. Iwamura, T., et al., *Induction of IRF-3/-7 kinase and NF-kappaB in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways*. Genes Cells, 2001. 6(4): p. 375-88.
48. Johnson, R.A., et al., *Human cytomegalovirus up-regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway: inhibition of PI3-K activity inhibits viral replication and virus-induced signaling*. J Virol, 2001. 75(13): p. 6022-32.
49. Johnson, R.A., S.M. Huong, and E.S. Huang, *Activation of the mitogen-activated protein kinase p38 by human cytomegalovirus infection through two distinct*

- pathways: a novel mechanism for activation of p38*. J Virol, 2000. 74(3): p. 1158-67.
50. Shibutani, T., et al., *Pertussis toxin-sensitive G proteins as mediators of the signal transduction pathways activated by cytomegalovirus infection of smooth muscle cells*. Journal of Clinical Investigation, 1997. 100: p. 2054-2061.
  51. Boyle, K.A., R.L. Pietropaolo, and T. Compton, *Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the Interferon-Responsive pathway*. Molecular and Cellular Biology, 1999. 19: p. 3607-3613.
  52. Speir, E., et al., *Aspirin attenuates cytomegalovirus infectivity and gene expression mediated by cyclooxygenase-2 in coronary artery smooth muscle cells*. Circ Res, 1998. 83(2): p. 210-6.
  53. Lin, R., Y. Mamane, and J. Hiscott, *Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains*. Mol Cell Biol, 1999. 19(4): p. 2465-74.
  54. Lin, R., P. Genin, Y. Mamane and J. Hiscott., *Selective DNA binding and association with CBP co-activator contribute to differential activation of type I interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7*. Molecular and Cellular Biology, 2000. 20(17): p. 6342-6353.
  55. Kol, A., et al., *Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages*. J Clin Invest, 1999. 103(4): p. 571-7.
  56. Nakaya, T., et al., *Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 283(5): p. 1150-6.
  57. Mogensen, T.H. and S.R. Paludan, *Molecular pathways in virus-induced cytokine production*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. 65(1): p. 131-50.
  58. Boehme, K.W., et al., *Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B*. J Virol, 2004. 78(3): p. 1202-11.
  59. Carlquist, J.F., et al., *Cytomegalovirus induction of interleukin-6 in lung fibroblasts occurs independently of active infection and involves a G protein and the transcription factor, NF-kappaB*. J Infect Dis, 1999. 179(5): p. 1094-100.
  60. Binder, C.J., et al., *Innate and acquired immunity in atherogenesis*. Nat Med, 2002. 8(11): p. 1218-26.

61. Epstein, S.E., *The multiple mechanisms by which infection may contribute to atherosclerosis development and course*. Circ Res, 2002. 90(1): p. 2-4.
62. Buss, H., et al., *Constitutive and IL-1-inducible phosphorylation of p65 NF-kB at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including IKKalpha , IKKbeta , IKKepsilon , TBK1 and an unknown kinase and couples p65 to TAFII31-mediated IL-8 transcription*. J Biol Chem, 2004.
63. von Hundelshausen, P., et al., *RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium*. Circulation, 2001. 103(13): p. 1772-7.
64. Yun, J.J., et al., *Rantes production during development of cardiac allograft vasculopathy*. Transplantation, 2001. 71(11): p. 1649-56.
65. Parissis, J.T., et al., *Serum profiles of C-C chemokines in acute myocardial infarction: possible implication in postinfarction left ventricular remodeling*. J Interferon Cytokine Res, 2002. 22(2): p. 223-9.
66. Veillard, N.R., et al., *Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice*. Circ Res, 2004. 94(2): p. 253-61.
67. Mach, F., et al., *Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells*. J Clin Invest, 1999. 104(8): p. 1041-50.
68. Kawamura, A., et al., *CXCR3 chemokine receptor-plasma IP10 interaction in patients with coronary artery disease*. Circ J, 2003. 67(10): p. 851-4.
69. Burnett, M.S., et al., *Murine cytomegalovirus infection increases aortic expression of proatherosclerotic genes*. Circulation, 2004. 109(7): p. 893-7.
70. Zhu, H., J.-P. Cong, and T. Shenk, *Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. 94: p. 13985-13990.
71. Zhu, H., et al., *Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(24): p. 14470-5.
72. Simmen, K.A., et al., *Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(13): p. 7140-5.

73. Compton, T., *Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus*. Trends Cell Biol, 2004. 14(1): p. 5-8.
74. Ewald, J.A., et al., *Ligand- and kinase activity-independent cell survival mediated by the epidermal growth factor receptor expressed in 32D cells*. Exp Cell Res, 2003. 282(2): p. 121-31.
75. Feire, A.L., H. Koss, and T. Compton, *Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(43): p. 15470-5.
76. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(7): p. 499-511.
77. Servant, M.J., N. Grandvaux, and J. Hiscott, *Multiple signaling pathways leading to the activation of interferon regulatory factor 3*. Biochem Pharmacol, 2002. 64(5-6): p. 985-92.
78. Compton, T., et al., *Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2*. J Virol, 2003. 77(8): p. 4588-96.
79. McGettrick, A.F. and L.A. O'Neill, *The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction*. Mol Immunol, 2004. 41(6-7): p. 577-82.
80. Castrillo, A., et al., *Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism*. Mol Cell, 2003. 12(4): p. 805-16.



## Footnotes

The abbreviations used are: HCMV, human cytomegalovirus; SeV, Sendai virus; IRF-3, Interferon Regulatory Factor-3; I $\kappa$ B kinase, IKK; LPS, Lipopolysaccharide; dsRNA, double-stranded RNA; IFN, Interferon; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted; IP-10, interferon-gamma-inducible protein 10; TBK1, Tank-binding kinase 1; Ang II, angiotensin II; LPA, Lysophosphatidic acid; PTX, *Pertussis toxin*; TLR, Toll-like receptor; GPCR, G protein-coupled receptor; EGFR, epidermal growth factor receptor; HAOSMC, human aortic smooth muscle cells; MOI, multiplicity of infection; AT, atherosclerosis.

This work was supported by a research grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). M.S. is a scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and is a recipient from a Rx&D/CIHR Health Research Foundation Career Awards in Health Sciences.

## Figure legends

**Figure 1.** Phosphotransferase activities of mitogen-activated protein kinases in primary HAOSMC infected with HCMV. Cells were left untreated (-) or infected for different periods of time with HCMV, then whole cell extracts (WCE) were prepared and used for measurements of ERK1, p38 and JNK2 kinase activities using immune complex and MBP, GST-ATF2, and GST-c-Jun as substrates respectively.

**Figure 2.** Activation of TBK1 in primary HAOSMC infected by HCMV. A) Cells were left untreated (-) or infected with HCMV for different time points. Kinase assay (KA) activity of TBK1 was measured on whole cell extracts (WCE) by immune complex kinase assay using GST-IRF-3 as substrate. (IB) immunoblot; the upper part of the gel was probed with a TBK1 antibody to confirm equal amount of the immunoprecipitated kinase. (CS), Coomassie staining; the lower part of the gel was stained with coomassie before drying to verify equal amount of substrate. B) Cells were infected with HCMV or SeV (used as a positive control) for 6 hours or left uninfected (-). Activity of TBK1 was measured by immune complex kinase assay using the different GST-IRF-3 substrate as schematically represented in C.

**Figure 3.** Activation of the canonical and the noncanonical IKK complexes in HAOSMC. Cells were left untreated (-) or infected with HCMV or SeV (positive control) for different time points. A) TBK1 kinase assay (KA) was accomplished on whole cell extracts (WCE) as described in Fig. 2. B) IKK complex kinase assay (KA) was measured by immune complex kinase assay using GST-I $\kappa$ B $\alpha$  as substrate. C) WCE derived from HCMV-infected HAOSMC were prepared and subjected to TBK1 kinase assay (KA, panel *a*) and IKK complex kinase assay (panel *b*) or analyzed by immunoblotting (IB) using an anti-

phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32) antibody (panel *c*). The membrane was stripped and reprobed with an anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody (panel *d*) followed by an anti- $\beta$ -actin antibody (panel *e*). D) IKK complex kinase assay (panel *a*) and immunoblot analysis (IB) of Ser 32 phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  using an anti-phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32) antibody (panel *b*) were accomplished on WCE derived from SeV-infected HAOSMC.

**Figure 4.** IRF-3 activation by HCMV in HAOSMC. Cells were left untreated (-) or infected for different periods of time with HCMV in the presence or absence of cycloheximide (100  $\mu$ g/ml). A) Endogenous IRF-3 proteins were detected in whole cell extract (WCE) by immunoblotting using anti-NES antibody that reacts against the nuclear export sequence of human IRF-3. B) Endogenous phosphorylation of IRF-3 on Ser396 present in WCE was detected by immunoblotting with the IRF-3 phosphospecific antibody (HIS 5033). C) Native PAGE analysis. WCE were prepared and subjected to native PAGE followed by immunoblotting with the anti-NES antibody.

**Figure 5.** DNA binding activity of IRF-3 in HAOSMC infected with HCMV. Cells were left untreated (-) or infected for different periods of time with HCMV in the presence or absence of cycloheximide (100  $\mu$ g/ml). A) Whole cell extracts (WCE) were analyzed by EMSA using an ISG15-specific oligonucleotide as a probe. Anti-IRF-3 was added in lanes 11 and 12. B) EMSA were carried out on WCE in the absence (lane C) or presence of a 100-fold excess of homologous oligonucleotide (lane H) or a mutant oligonucleotide with a single base pair difference from the probe (lane M).

**Figure 6.** Roles of IKK $\epsilon$  and TBK1 in HCMV-induced IRF-3 activation in primary HAOSMC. A) Whole cell extracts (WCE, 70  $\mu$ g) prepared from primary HAOSMC and the U937 monocytic cell line were subjected to immunoblot analysis using an antibody that recognized both IKK-related isoforms. B) siRNA-mediated knockdown of IKK-related kinases isoforms. HAOSMC were transfected with a siCONTROL Non-targeting silencing

RNA (Control) or RNA duplexes designed to specifically target IKK $\epsilon$  and TBK1 as indicated. 64 hours post-transfection, cells were left uninfected (-) or infected with HCMV for the indicated time. WCE were prepared and analyzed for IKK $\epsilon$  and TBK1 expression by immunoblotting as describe in A (panel *a*). The membrane was stripped and reprobed with an anti- $\beta$ -actin to verify equal loading of proteins (panel *b*). C) Densitometry analysis of the blot shown in B. Each value was graphed as relative protein intensity normalized to  $\beta$ -actin. Closed bars, relative amount of IKK $\epsilon$ ; Open bars, relative amount of TBK1. D) WCE from B were used in Native-PAGE analysis to verify the dimerization state of IRF-3.

**Figure 7.** Proatherosclerotic chemokines induction by HAOSMC infected with HCMV. A) RT-PCR analysis. Cells were infected for different periods of time with HCMV. Total RNA was prepared and analyzed for *Cxcl10* and *Ccl5* expression by RT-PCR. B) Cartesian array analysis. HAOSMC were infected or left uninfected (-) for 20 hours. Then, the supernatants were collected and subjected to immunoblotting using cytokine arrays membranes. The arrows indicate the presence of three induced cytokines in the supernatant of HAOSMC infected with HCMV.

**Figure 8.** IRF-3-dependent cytokine production by rat VSMC infected with HCMV. A) Following infection with a retrovirus encoding for a dominant negative version of IRF-3 ( $\Delta$ NIRF-3), stable selected clones were analyzed by immunoblotting for the expression of the transgene. B) Following infection of rat VSMC with HCMV for different periods of time, total RNA was prepared and analyzed for *Ccl5* and *Cxcl10* gene induction by RT-PCR. C) Quantification of the relative yields of PCR product was determined with a Gel Documentation device (Typhoon 9410). Each value was graphed as relative transcripts intensity normalized to  $\beta$ -actin. Closed bars, relative amount of *Ccl5* transcripts; Open bars, relative amount of *Cxcl10* transcripts.

**Figure 9.** Role of EGFR and G*α*i/o pathways in the activation of the TBK1/IRF-3 pathway by HCMV in VSMC. A) ERK1 kinase assay. Quiescent rat VSMC were pretreated for 16 h with PTX (P, 100 ng/ml), 30 min with AG1478 (A, 250 nM) or the vehicle dimethylsulfoxide (D, 0.01%) and then stimulated for the indicated times with 100 nM Ang II and 20 μM LPA. Whole cell extracts (WCE) were prepared and the phosphotransferase activity of ERK1 was measured by immune complex kinase assay using MBP as substrate. B, C, and D) HAOSMC were pretreated with AG1478 and PTX as described in A and then infected with SeV (S; used as a positive control) or HCMV (H) for 6 hours. WCE were prepared and IRF-3 activation was measured by immunoblotting (B and C) as well as native-PAGE (D). E) DNA binding activity of IRF-3. HAOSMC were left uninfected (-) or infected with HCMV for the indicated times. WCE were prepared and subjected to EMSA analysis using ISG15-specific oligonucleotide as a probe. F) Activation of TBK1 in rat VSMC. Parental and HERCD533 cells were infected with HCMV for the indicated time and the activity of TBK1 was measured by immune complex kinase assay using GST-IRF-3 as substrate. G) Activation of TBK1 in HAOSMC. Cells were pretreated for 16 h with PTX (P, 100 ng/ml), 30 min with AG1478 (A, 250 nM) or the vehicle dimethylsulfoxide (D, 0.01%) and then left uninfected (-) or infected for 6 hours with HCMV. The phosphotransferase activity of TBK1 was measured by immune complex kinase assay using GST-IRF-3 as substrate.

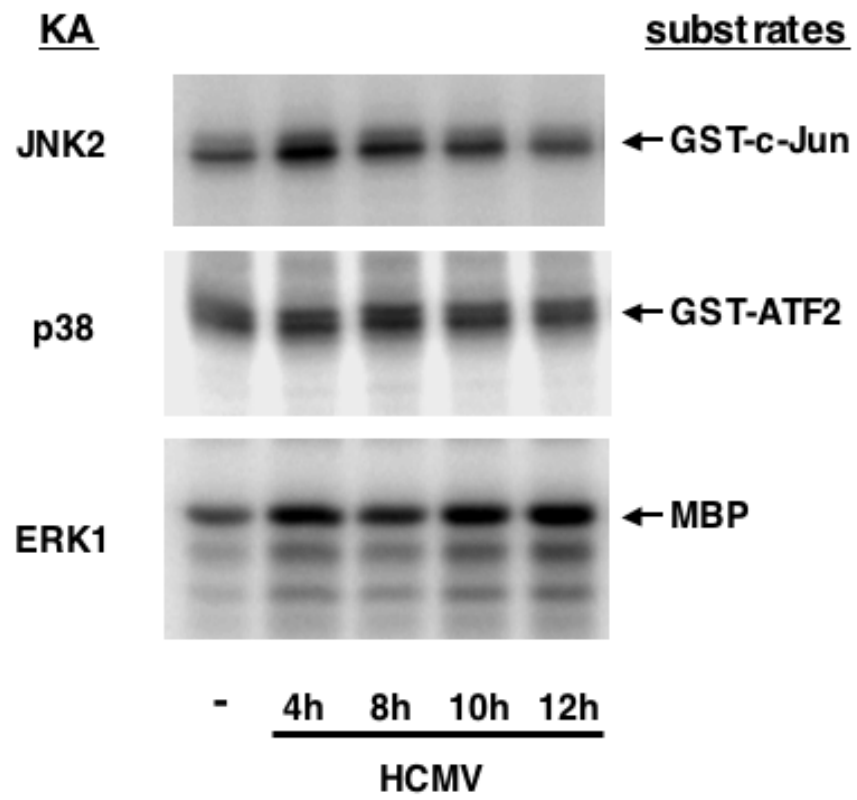


Figure 1

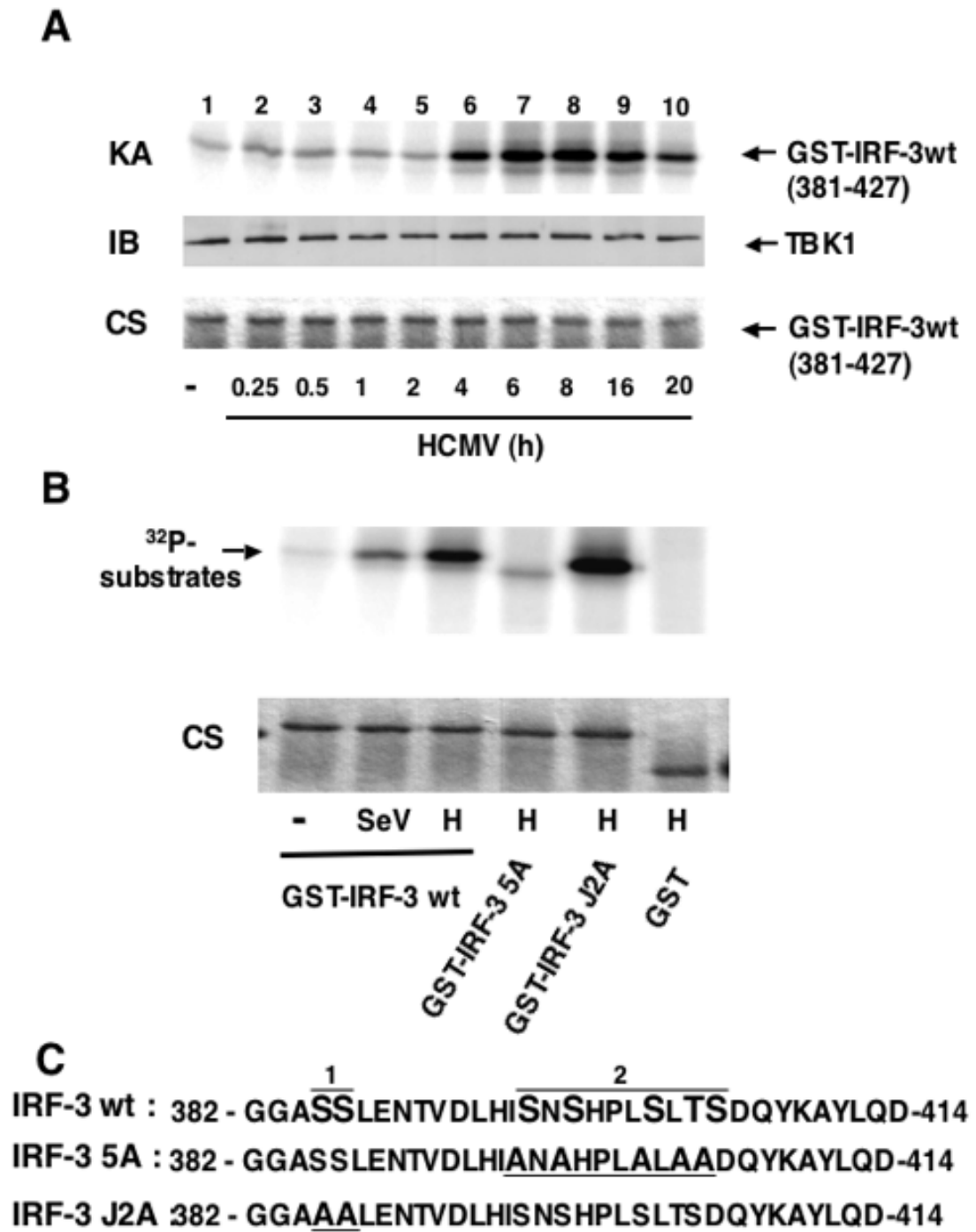


Figure 2

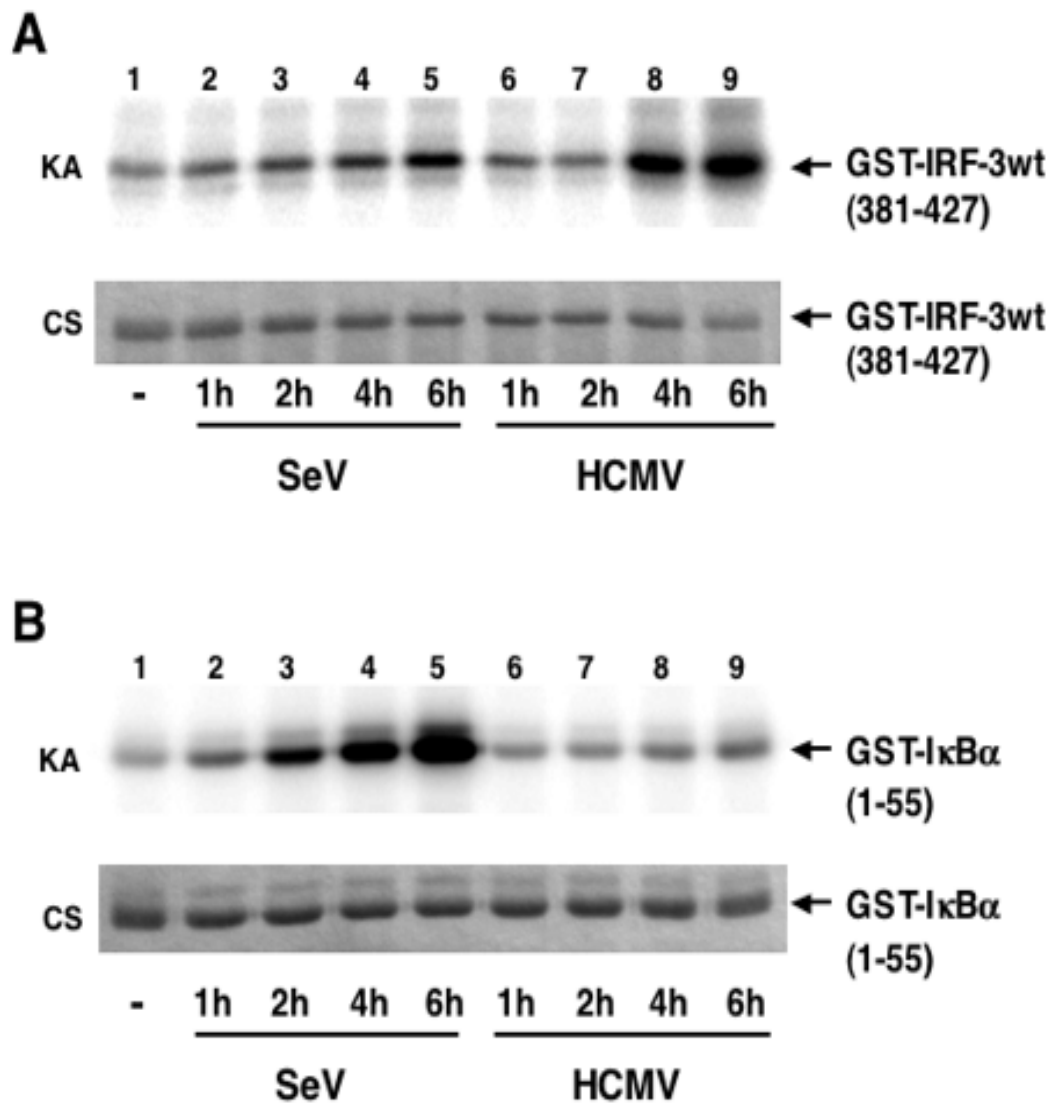


Figure 3



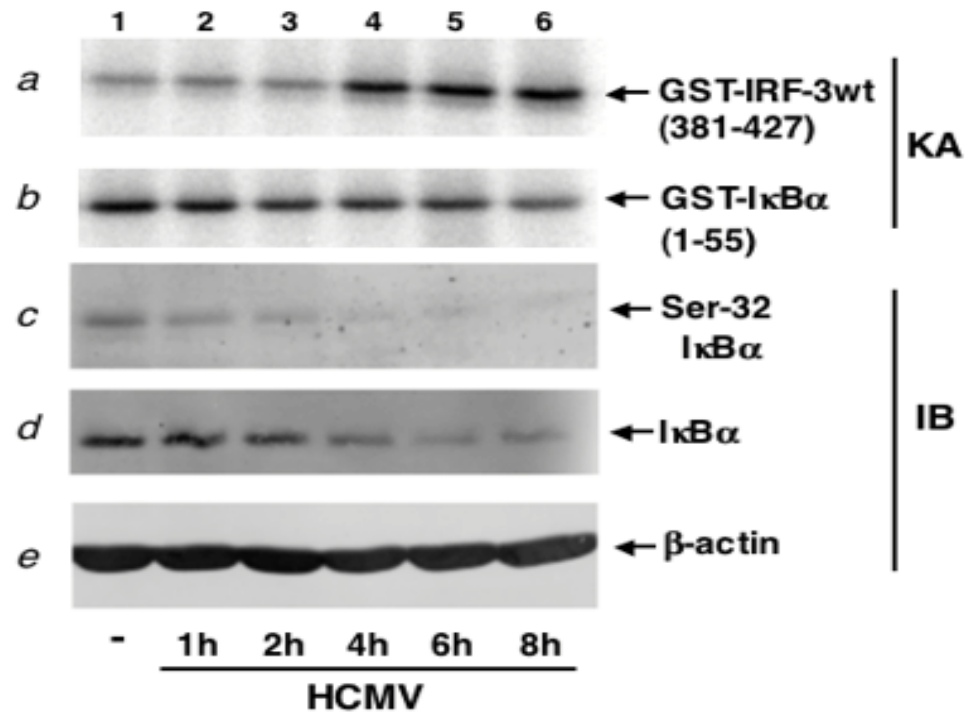
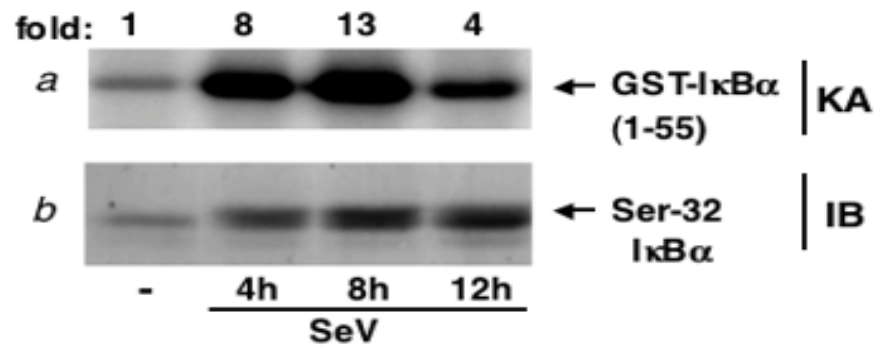
**C****D**

Figure 3

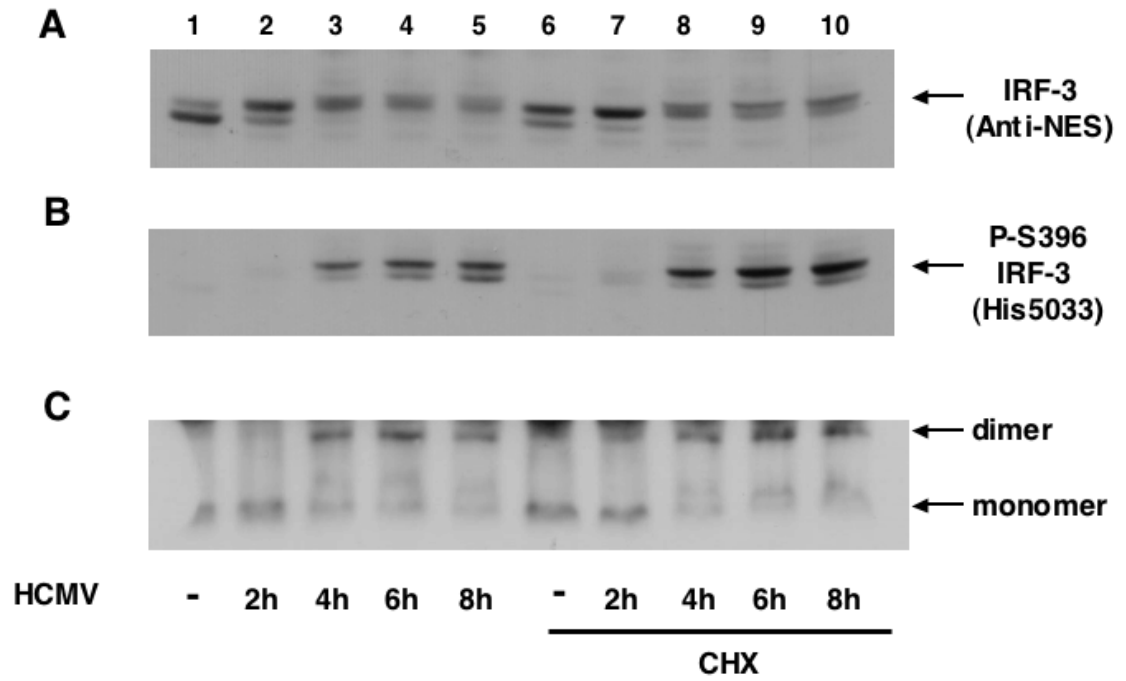


Figure 4

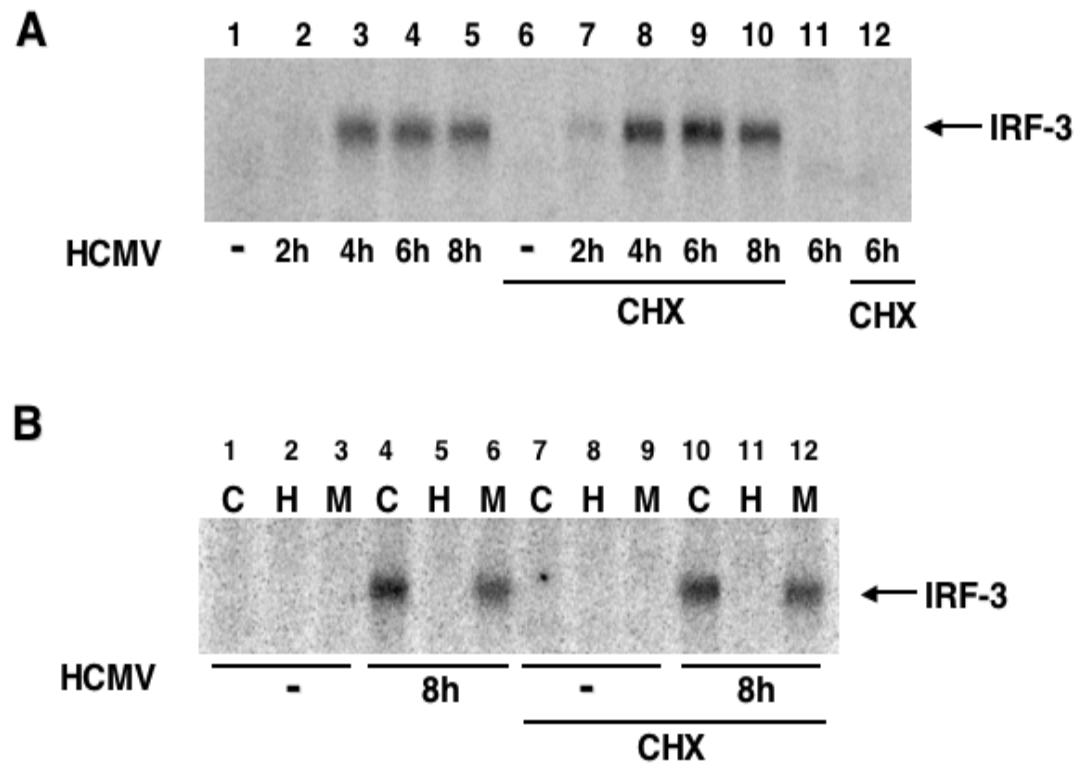


Figure 5

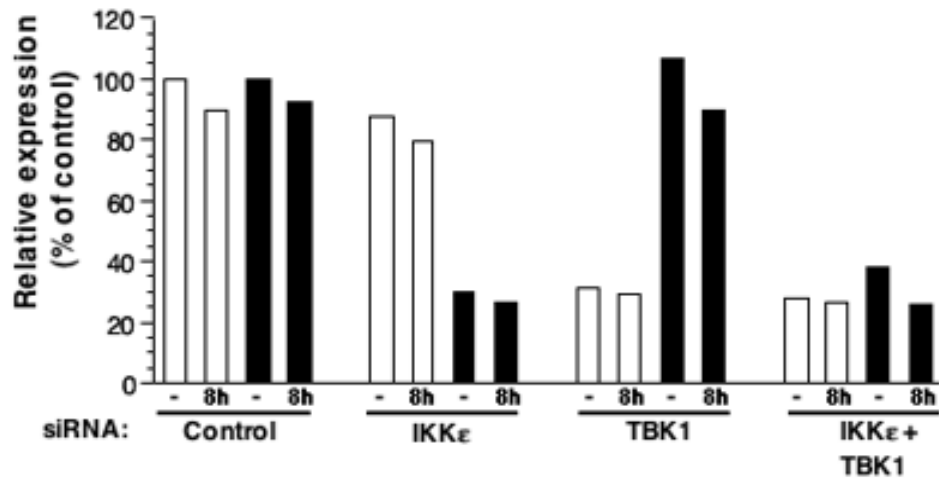
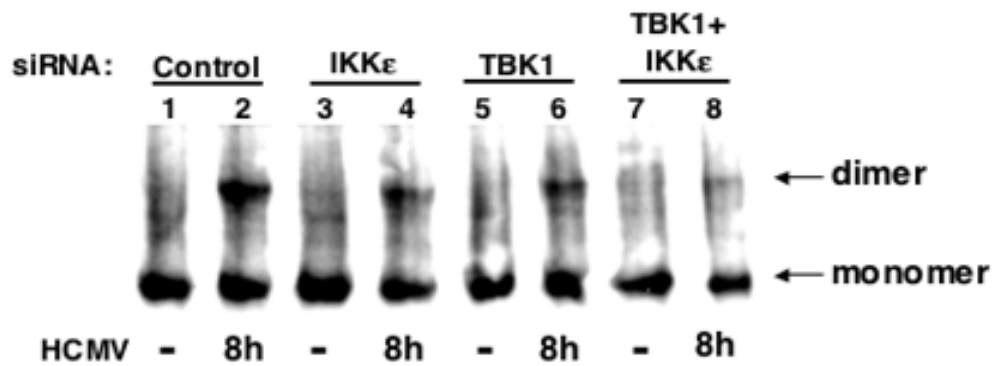
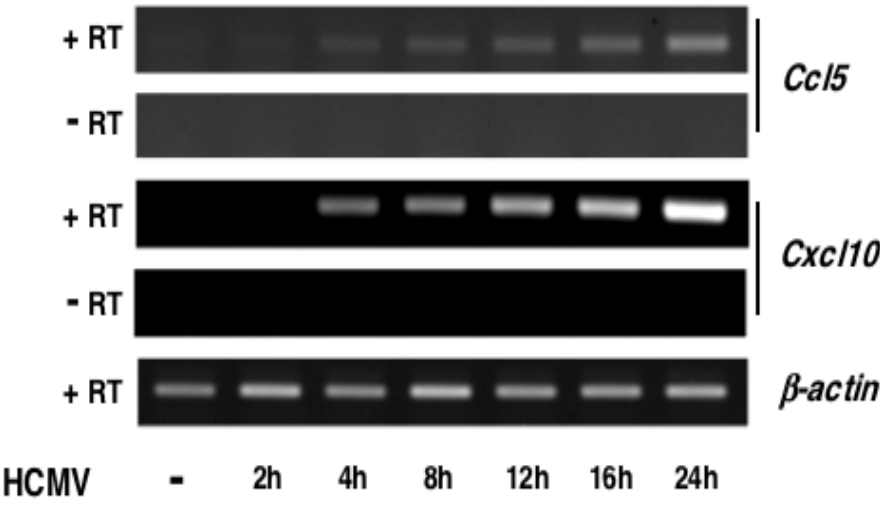
**C****D**

Figure 6

**A**



**Figure 7**

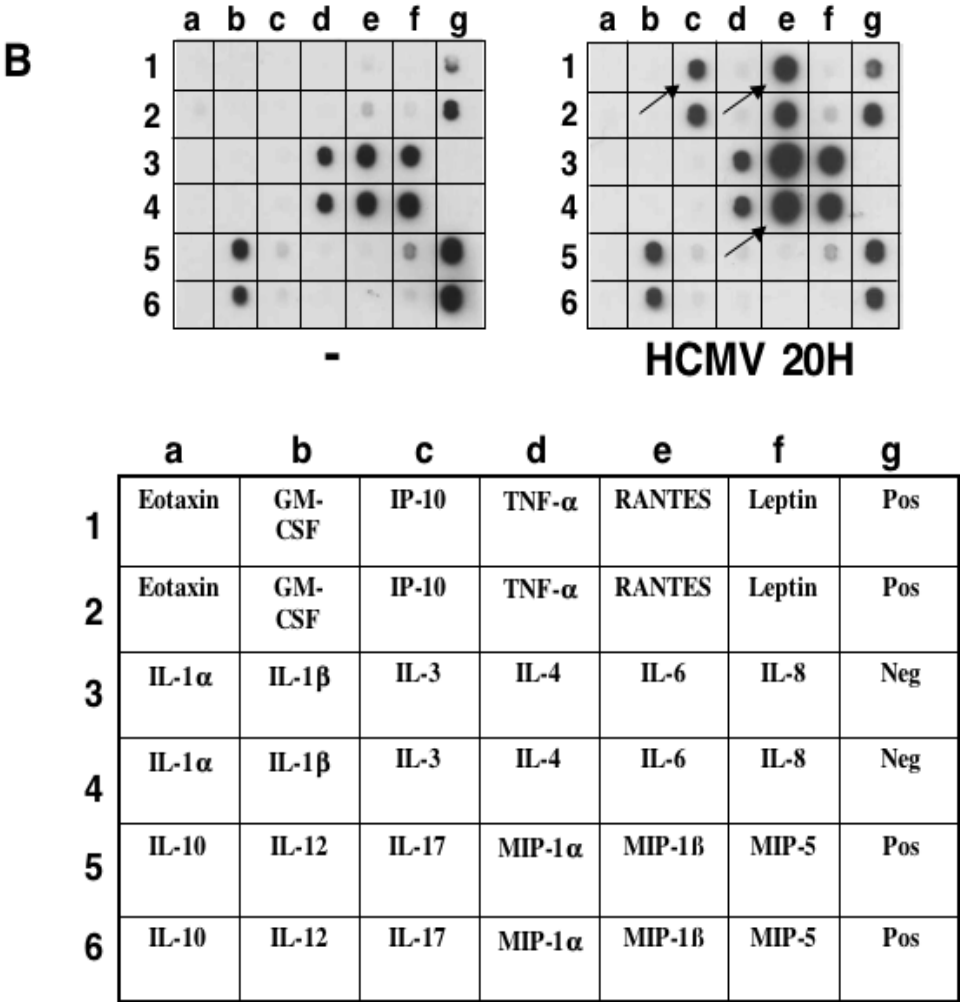


Figure 7

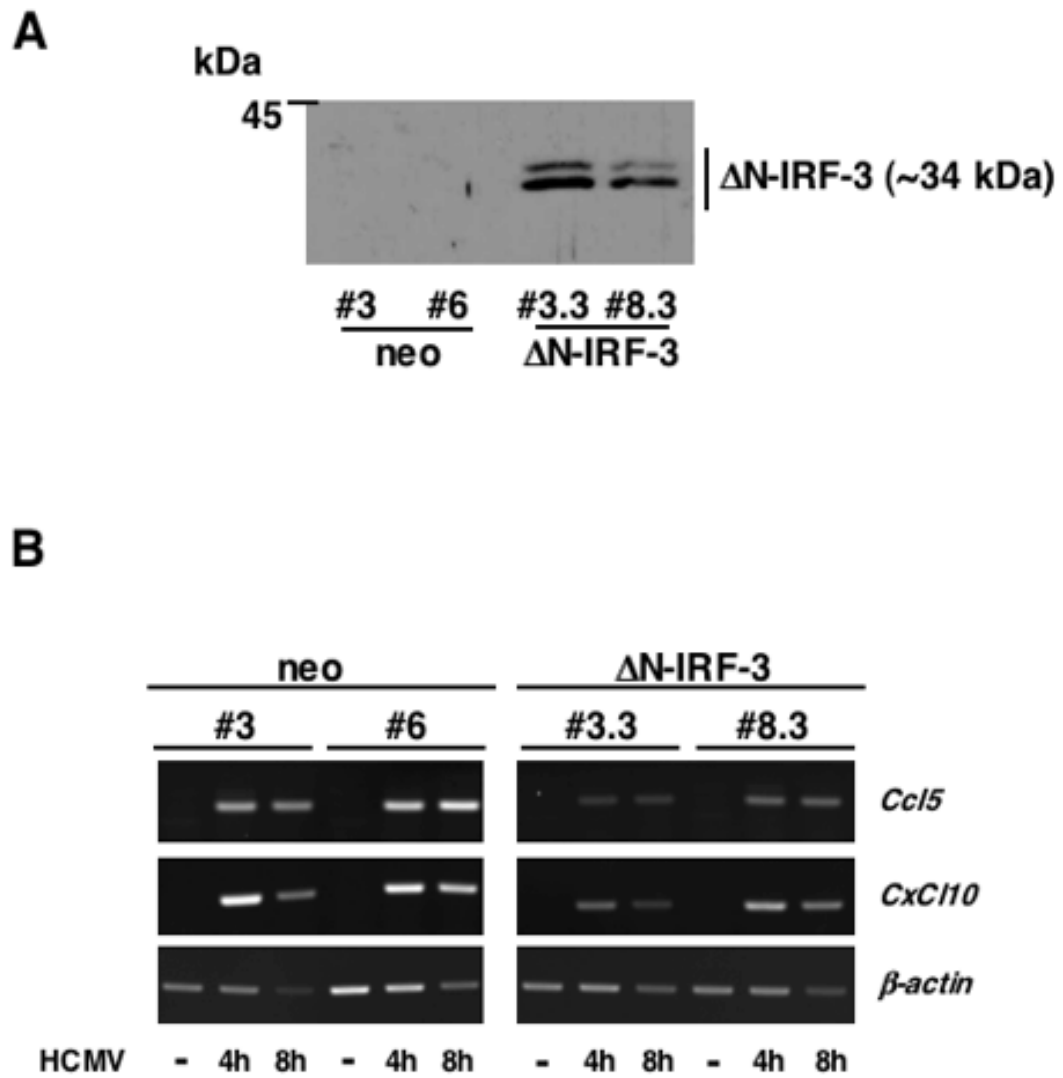
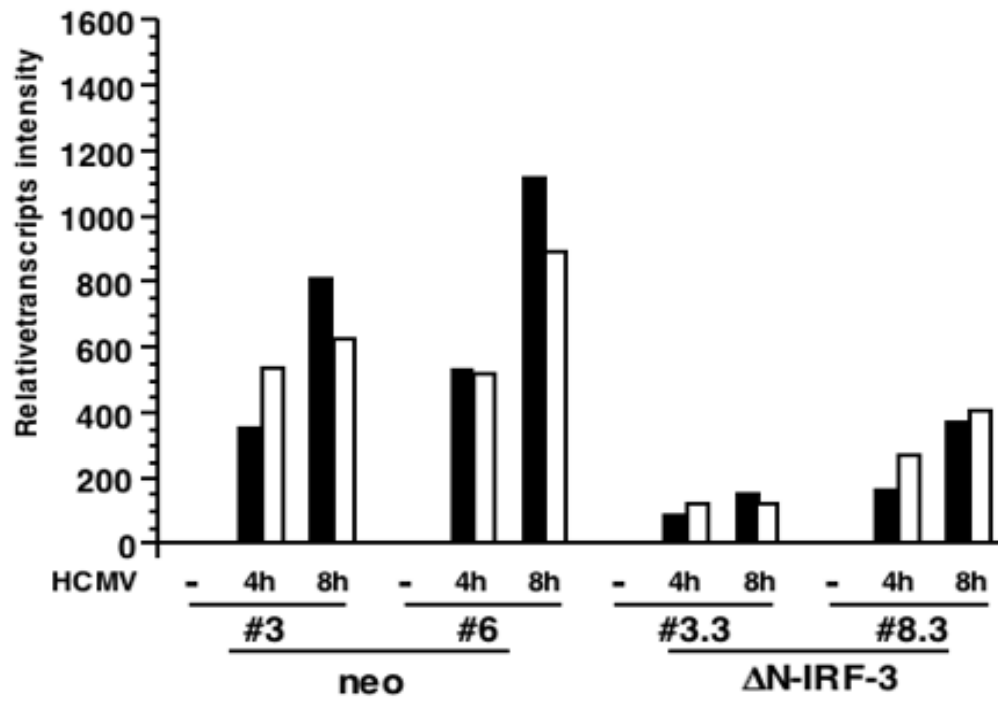


Figure 8

**C**



**Figure 8**



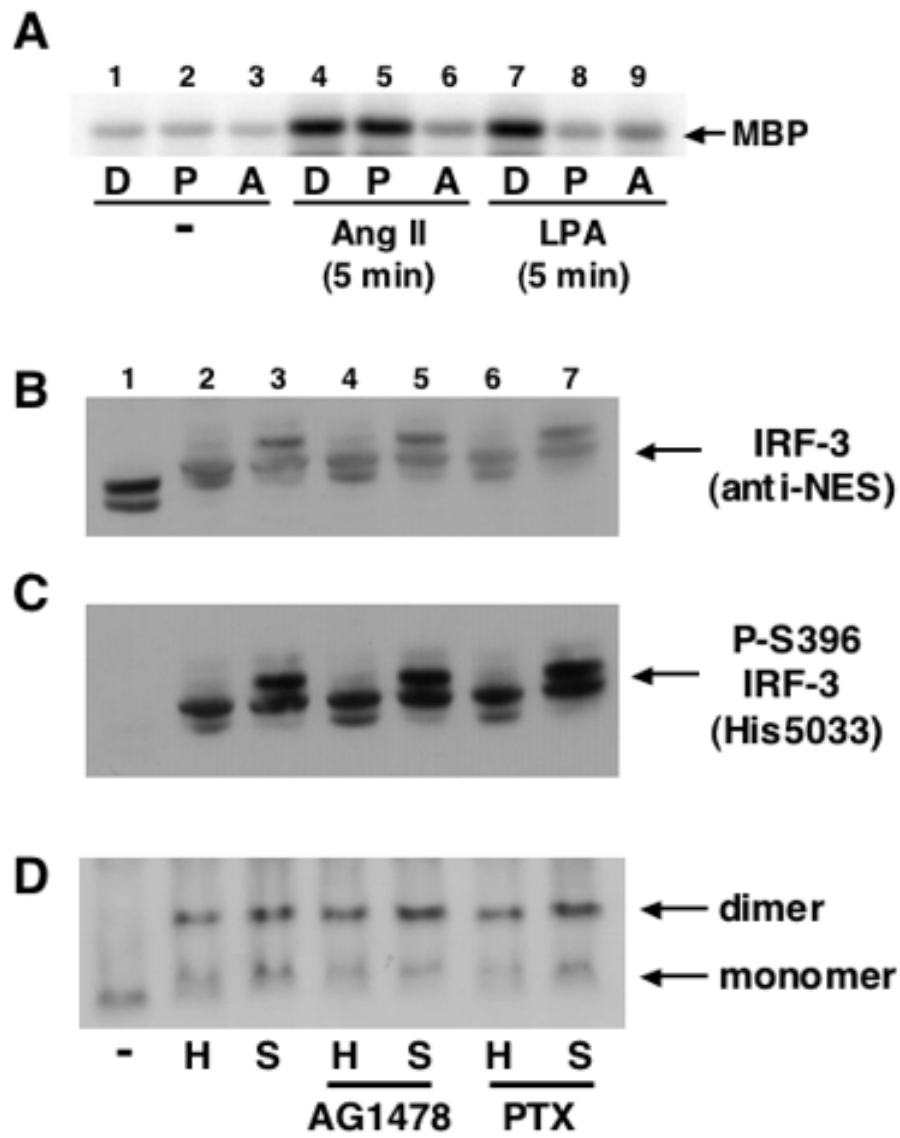


Figure 9

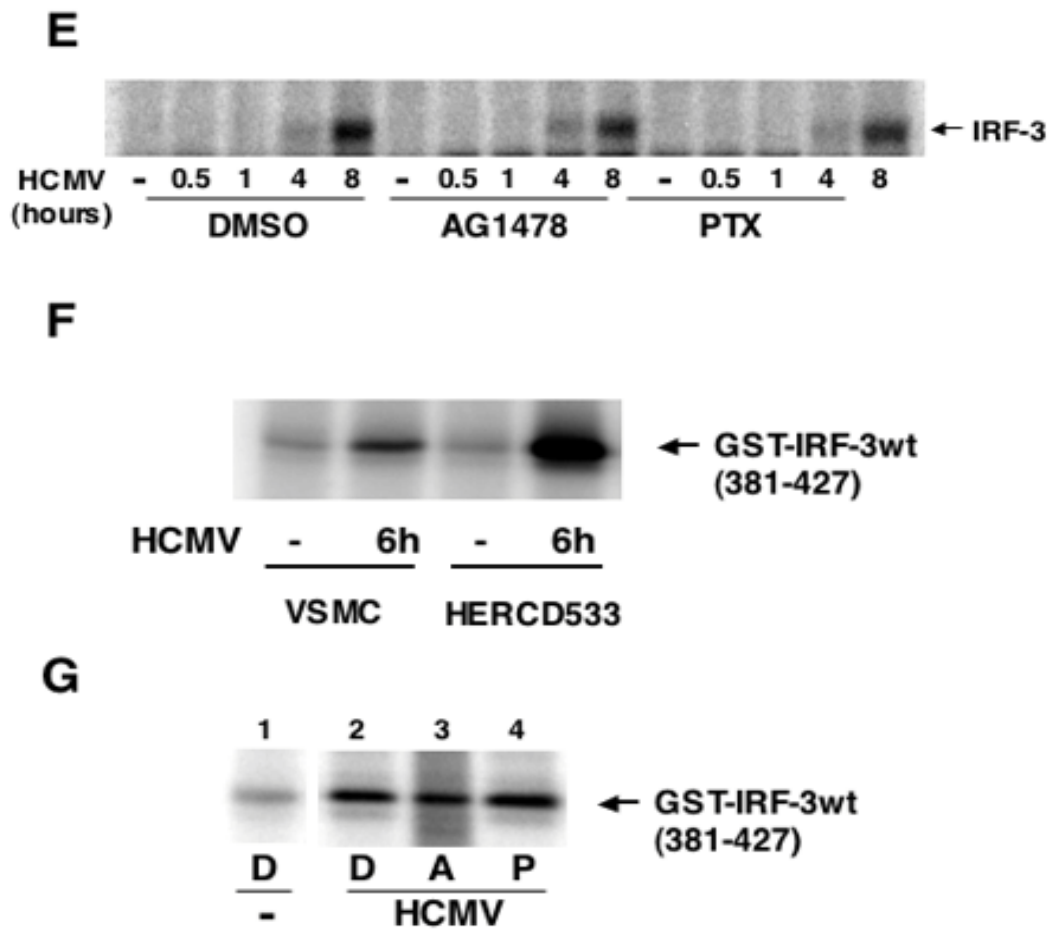


Figure 9

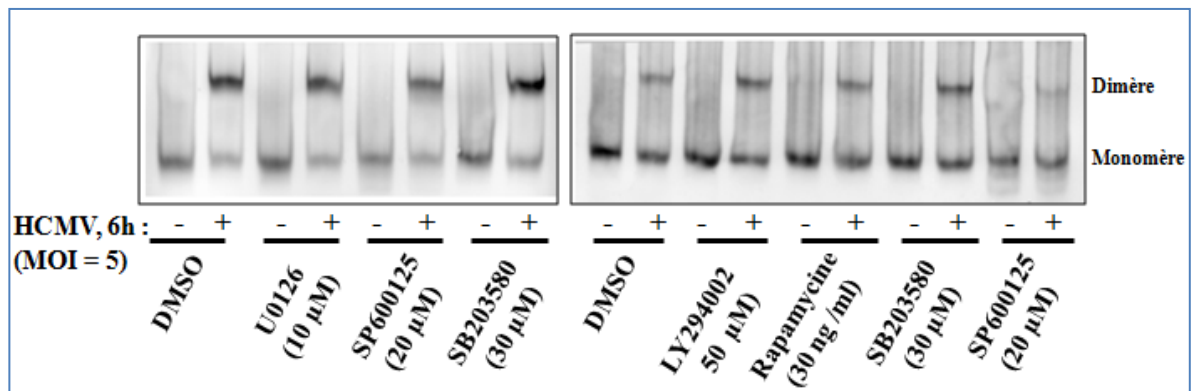
### 5.1.5 Résultats connexes

Nous avons effectué entre 2005 et 2008 différentes expériences qui avaient pour but de déterminer l'identité des acteurs en amont de la voie TBK1-IRF-3 dans le cadre d'une infection au HCMV. Bien que ces résultats nous aient menés vers des pistes intéressantes, ils n'ont pas pu faire l'objet de publications, puisque d'autres groupes de recherche compétitifs nous ont devancés (voir la discussion aux sections 6.1.1 et 6.1.2). Nous présentons ici quelques résultats reproductibles que nous jugeons importants dans le cadre de cette thèse, et qui ajoutent des informations d'actualité à l'article présenté précédemment.

Une première série d'expériences visait à prétraiter les VSMC humaines à l'aide de différents inhibiteurs, allant d'inhibiteurs spécifiques de kinases (Rho kinase, MEK, JNK, etc.) à des composés chélateurs de calcium (BABTA-AM) ou différents composés touchant les petites protéines G (toxine B) ou les microtubules (nocodazole), en vue de limiter l'activation d'IRF-3 par le HCMV. La grande majorité de ces traitements n'avaient pas le moindre effet sur l'activation d'IRF-3, tel qu'analysé par formation de dimère en gel natif (Gravel SP & Servant MJ, résultats non-publiés). Mentionnons avec prudence que le BABTA-AM avait la capacité de bloquer complètement la dimérisation d'IRF-3 par le virus. Nous comprendrons que de multiples protéines nécessitent le calcium ou d'autres cations divalents pour exercer leurs fonctions, et que la recherche d'un ou des effecteurs sensibles à l'action du BABTA-AM semble trop diffuse pour pouvoir être poursuivie. Par ailleurs, nous avons remarqué à quelques reprises l'impact du SP600125, un inhibiteur de la MAPK JNK, sur la dimérisation d'IRF-3 (figure 34). Nous discutons à la section 6.1.1 des liens désormais connus entre la voie TBK1-IRF-3 et la voie du stress dépendante de JNK.

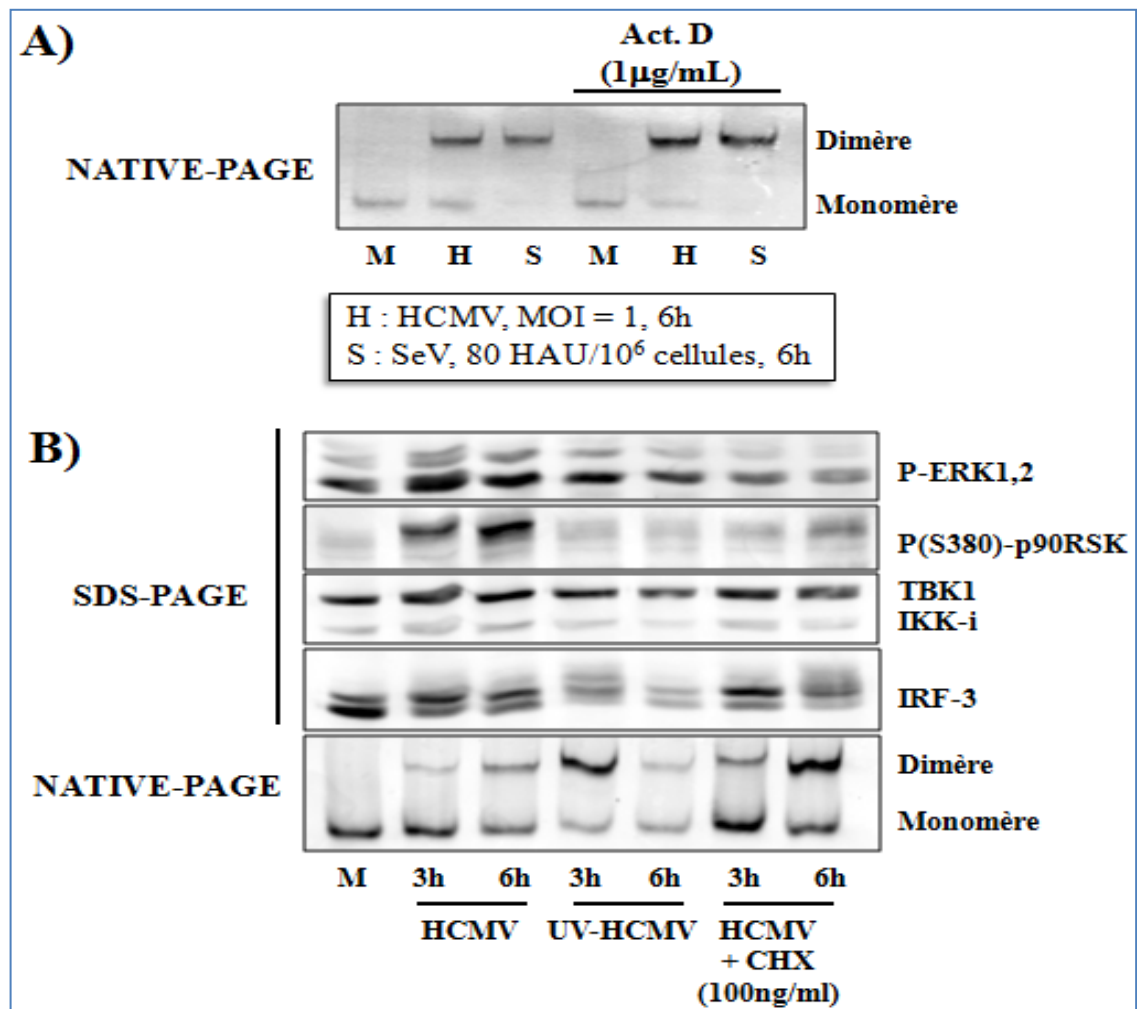
La reconnaissance de PAMP peut avoir lieu à la surface extracellulaire et dans les endosomes, ou bien dans le cytosol (section 1.3.2). En ce qui concerne les virus, une littérature abondante met de l'avant le rôle des acides nucléiques viraux dans l'induction de la réponse interféron. Le HCMV est un virus à ADNdb, un PAMP dont les récepteurs

étaient inconnus au moment de la publication de notre étude (voir section 6.1.2 et figure 40). Puisque les ARNs étaient connus pour induire la voie TBK1-IRF-3, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle des intermédiaires de réplication viraux, par exemple des ARNdb (ou des structures secondaires propres aux ARNs du HCMV) pouvaient être responsables de l'activation d'IRF-3 dans nos expériences. Afin de vérifier si le HCMV devait se répliquer pour induire l'activation d'IRF-3, nous avons inactivé la préparation virale aux rayonnements UV, puis avons utilisé l'avons utilisée pour induire l'activation d'IRF-3. Cette expérience montre clairement que le HCMV défectif a toujours la capacité d'induire IRF-3 (figure 35B). De plus, l'activation d'IRF-3 est plus forte suivant une infection avec le UV-HCMV, en comparaison au même virus non-traité aux UV, à un MOI identique.



**Figure 34 : Exemples d'essais inhibiteurs effectués pour identifier les kinases impliquées dans l'activation d'IRF-3 par le HCMV dans les VSMC humaines.**

Les cellules HAOSMCs (#354-05a, Cell Applications, Inc.) ont été traitées avec les différents inhibiteurs ou le DMSO, 30 minutes avant l'infection avec le HCMV. Les procédures de lyse cellulaire, d'électrophorèse sur gel non-dénatant et d'immunobuvardage sont présentées dans l'article #1. Le U0126, inhibiteur de MEK (cat # EI-282) provient de Enzo Life Sciences ; le SP600125, inhibiteur de JNK (cat # S-2022) provient de A.G. Scientific, Inc.; le SB203580, inhibiteur de p38 (cat # 559389), le LY 294002, inhibiteur de PI3K (cat # 440202) et la rapamycine, inhibiteur de mTOR (cat # 553210) proviennent de Calbiochem. Remarquons l'atténuation de la dimérisation d'IRF-3 lors du pré-traitement au SP600125, particulièrement évidente dans l'image de droite.

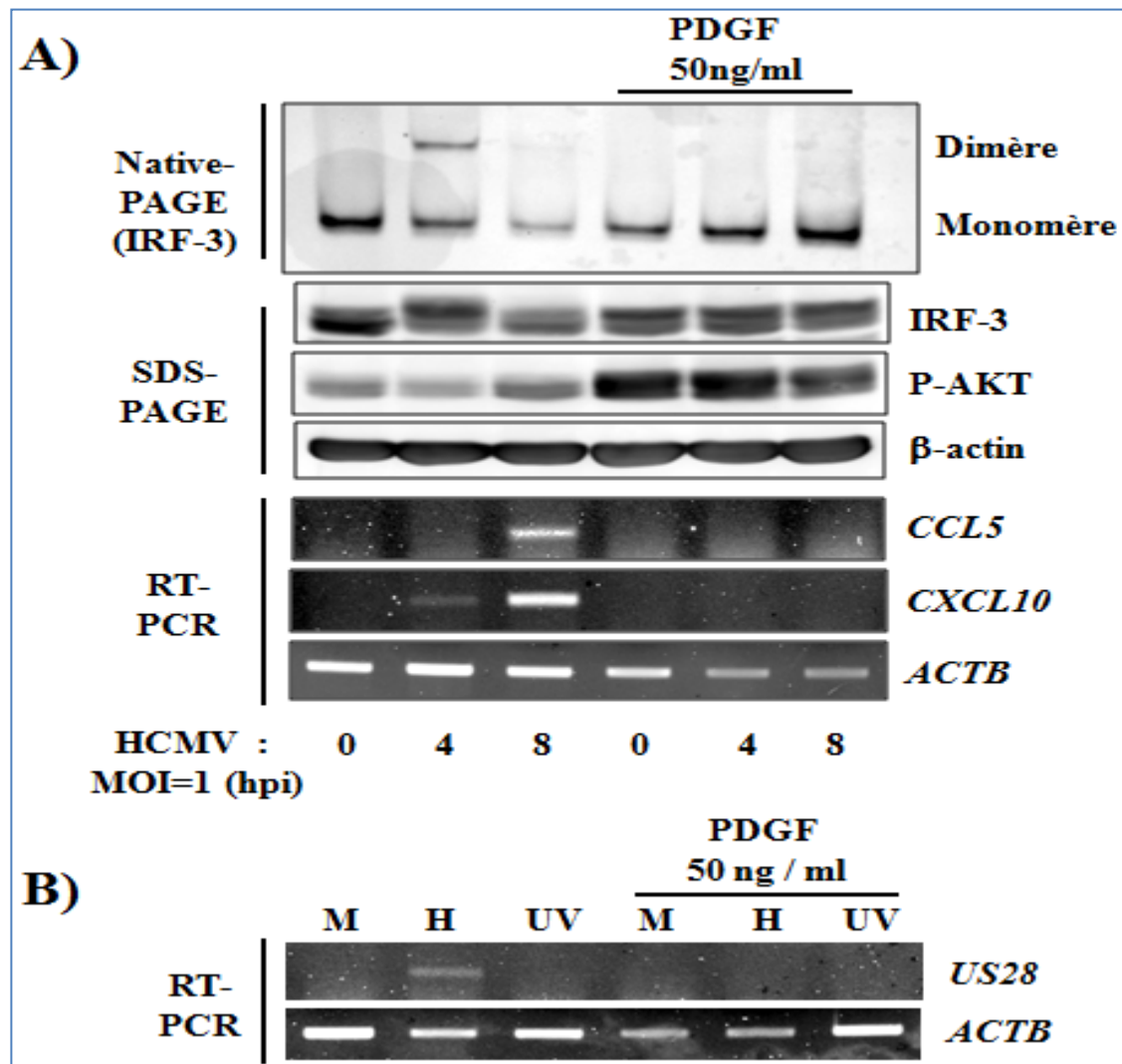


**Figure 35 : La transcription et la réplication virale ne sont pas impliquées dans l'activation d'IRF-3 par le HCMV.**

**A)** Les fibroblastes humains MRC5 ont été traités à l'actinomycine D pendant 30 minutes avant l'infection au HCMV. L'activation d'IRF-3 a été évaluée par gel natif suivi d'un immunobuvardage dirigé contre IRF-3 (NES), tel que décrit dans l'article #1. **B)** Le HCMV, en suspension dans du DMEM sur glace, a été inactivé aux ultraviolets (UV-HCMV) pendant 1h sous les rayons d'une enceinte de culture stérile. Les MRC5 à 80% de confluence ont été infectés avec le HCMV ou le UV-HCMV à un MOI de 1 pour les temps indiqués, en présence ou en absence d'un prétraitement de 30 minutes à la cycloheximide (CHX). Les anticorps utilisés proviennent des compagnies suivantes : P-ERK1,2 : Invitrogen (Biosource), Thr202/Tyr204, # 36-8800; P-RSK : Cell Signaling, #9341; TBK1/IKK-i : IMGENEX, IMG-270A; IRF-3 : IBL, #18781.

Ce résultat va dans le même sens que celui obtenu par l'utilisation de CHX (article #1, figure 5) et d'actinomycine D (figure 35A), et suggère que des produits viraux issus de la transcription (et de la traduction), et non des produits de l'hôte, limitent l'activation d'IRF-3. Par ailleurs, nos résultats confirment également ceux d'une étude antérieure qui montre que le HCMV a la capacité de maintenir l'activité de la voie ERK, processus utile à la transcription de ses propres gènes [1379]. Notre protocole d'inactivation du HCMV aux UVs fonctionne bien, puisque cet effet sur ERK (et l'un de ses substrats, RSK) est perdu en présence de UV-HCMV, tel qu'attendu (figure 35B). Notons que le rôle précis de RSK dans la biopathologie du HCMV est inconnu.

Le laboratoire de Marc Servant s'intéresse aux procédés qui peuvent agir en synergie dans l'induction de la réponse inflammatoire. Nous avons d'ailleurs illustré quelques synergismes connus dans l'introduction de cette thèse. Ainsi, en parallèle aux expériences utilisant des inhibiteurs pharmacologiques présentés ci-haut, nous avons vérifié l'impact de certains traitements sur l'induction d'IRF-3 par le HCMV. Nous avons entre autres prétraité les cellules avec différents facteurs de croissance ou cytokines (PDGF, EGF, Insuline, Angiotensine II), dans différents types cellulaires sensibles à l'action de ces stimuli. La grande majorité de ces traitements n'avaient pas d'effet, sinon d'augmenter légèrement la phosphorylation basale d'IRF-3 (Gravel SP & Servant MJ, résultats non-publiés). Curieusement, le PDGF avait la capacité de bloquer complètement la dimérisation d'IRF-3 par le HCMV (figure 36A). Le PDGF avait en fait la capacité d'inhiber la néo-synthèse d'un gène viral (figure 36B), ce qui laissait croire que la signalisation amorcée par le PDGF avait un effet inhibiteur sur l'entrée du virus. Or, l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité kinase du récepteur du PDGF, le AG-1296, n'avait pas la capacité d'imiter le prétraitement au PDGF (Gravel SP & Servant MJ, résultats non-publiés). Il a été découvert plus tard que le récepteur du PDGF était en fait l'un des récepteurs d'entrée du HCMV (voir section 6.1.1), ce qui explique nos observations.

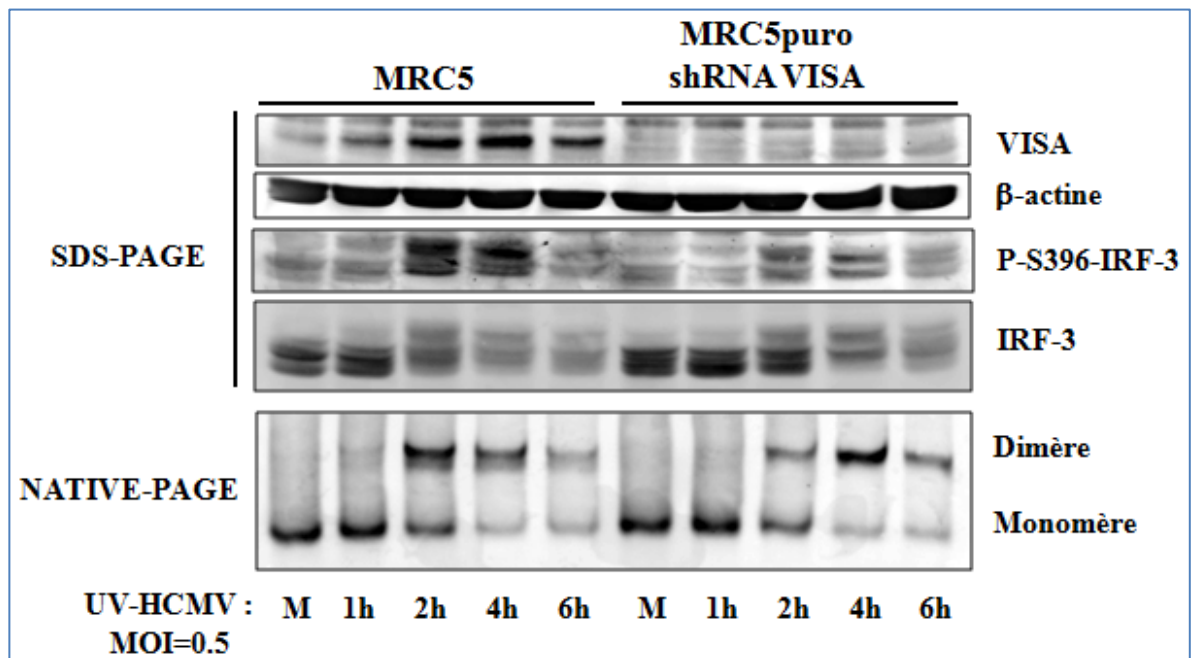


**Figure 36 : Un prétraitement au PDGF-BB bloque l'induction d'IRF-3 par le HCMV dans les VSMC**

Les VSMC (BN) de rat ont été traitées au PDGF-BB pendant 16h avant une infection au HCMV. **A)** Les VSMC ont été infectées en duplicats, afin d'effectuer en parallèle des analyses de PAGE par immunobuvardage et des RT-PCR pour les cytokines induites par IRF-3. Voir l'article #1 pour les conditions de RT-PCR, de SDS-PAGE et d'électrophorèse en gel natif. L'anticorps phospho-Sérine 473 AKT provient de Cell Signaling (#9271). **B)** Pour effectuer les RT-PCR, les extraits d'ARN ont été traités à la DNase I afin d'éliminer l'ADN génomique viral. Le UV-HCMV a été préparé tel que décrit précédemment (figure 35). Les amorces utilisées pour amplifier *US28* ont été conçues par SP Gravel et synthétisées par Invitrogen : sens : 5'-ATG ACA CCG ACG ACG ACG ACC-3', antisens : 5'-CCT AGG GAC TTG TGA TCT AG-3'. M : Mock; H : HCMV MOI = 1, 6h; UV : UV-HCMV MOI=1, 6h.

Nous avons finalement entrepris de vérifier l'implication de nouvelles molécules de l'immunité innée dans l'activation d'IRF-3 par le HCMV. Nous abordons de manière plus détaillée la totalité de ces molécules à la section 6.1.2 de cette thèse, et discutons de l'implication possible de l'une ou l'autre de celles-ci dans le contexte de l'infection au HCMV. Nous présentons à la figure 37 une expérience qui visait à vérifier le rôle de VISA (aussi appelé IPS-1, Cardif, MAVS) dans les fibroblastes humains infectés au UV-HCMV. Le UV-HCMV a été utilisé puisqu'il a la capacité d'induire de manière plus forte l'activation d'IRF-3, ce qui facilite l'étude de son activation (voir figure 35). Nos résultats suggèrent un rôle partiel de l'adaptateur mitochondrial VISA dans l'activation d'IRF-3 par le UV-HCMV. En effet, la phosphorylation d'IRF-3 au niveau de la sérine 396 est atténuée, et la cinétique de dimérisation du facteur de transcription est retardée. Ainsi, en condition où l'expression de VISA est fortement diminuée par ARNi, il semble que d'autres effecteurs de l'immunité innée soient utilisés pour répondre au HCMV. Un premier candidat de senseur à ADNdb lié à l'activation de la voie interféron a été caractérisé en 2007. Nous ne disposions pas à l'époque des outils nécessaires permettant de vérifier l'implication de DAI (ZBP1/DLM-1) dans l'activation d'IRF-3 par le HCMV. Nous invitons le lecteur à consulter la section 6.1.2 pour en connaître davantage sur les effecteurs en amont de TBK1 en réponse au HCMV et à l'ADNdb, découverts au cours des dernières années jusqu'à très récemment.





**Figure 37 : Rôle partiel de VISA dans l'activation d'IRF-3 par le UV-HCMV.**

Le UV-HCMV a été préparé tel que décrit précédemment (figure 35). La construction rétrovirale encodant pour le shRNA de VISA, ainsi que l'anticorps de lapin dirigé contre VISA nous ont été offerts par le Dr. Rongtuan Lin (McGill). Les rétrovirus recombinants ont été préparés dans des cellules amphotropiques, tel que décrit dans les articles #1 et #2. Les MRC5 infectés et exprimant le shRNA VISA ont été sélectionnés pendant 1-2 semaines à 1 µg/mL de puromycine. Les procédures de lyse cellulaire, d'électrophorèse et d'immunobuvardage sont décrites dans l'article #1.

## **5.2 ARTICLE # 2**

### **5.2.1 Description du travail effectué par le candidat.**

Simon-Pierre Gravel partage le titre de co-premier auteur avec Annie Douillette et Annie Bibeau-Poirier pour cet article, à cause de sa contribution majeure. Simon-Pierre Gravel a entre autres réalisé les éléments suivants :

- 1) Mise au point de techniques variées utilisées lors de cette étude :
  - RT-PCR
  - Production de rétrovirus recombinants
  - EMSA
  - Extractions cytosol-noyau
  - Essais kinases in vitro
  - Essais luciférases (non-publiés)
- 2) Réalisation et implication directe au niveau des résultats présentés aux figures suivantes :
  - Figure 4B
  - Figure 5A,B,D,F
  - Figure S1
  - Figure S4

### **5.2.2 Permission de l'éditeur**

.

**Lors de son deuxième dépôt, le candidat a placé ici une feuille faisant office d'autorisation de l'éditeur.**

### **5.2.3 Accord des coauteurs**

**Lors de son deuxième dépôt, le candidat a placé ici une feuille faisant office d'autorisation des coauteurs.**

#### **5.2.4 Article original**

## **THE PROINFLAMMATORY ACTIONS OF ANGIOTENSIN II ARE DEPENDENT ON p65 PHOSPHORYLATION BY THE I $\kappa$ B KINASE COMPLEX**

**Annie Douillette\*, Annie Bibeau-Poirier\*, Simon-Pierre Gravel\***, Jean-François  
Clément, Valérie Chénard, Pierre Moreau and Marc J. Servant

From the Faculty of Pharmacy, University of Montreal

Running title: IKK-dependent phosphorylation of p65 by Ang II

**\* These authors contributed equally to this work.**

## Abstract

The vasoactive hormone Angiotensin II (Ang II) probably triggers inflammatory cardiovascular diseases by activating transcription factors such as NF- $\kappa$ B. We describe here a novel mode of NF- $\kappa$ B activation in cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) exposed to Ang II. Ang II treatment resulted in an increase in the phosphotransferase activity of the IKK complex, which was mediated through the AT1 receptor subtype. The typical phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  were not observed. Rather, Ang II treatment of VSMC led to the phosphorylation of p65 on serine 536, a signal detected in both the cytoplasm and the nuclear compartments. The use of pharmacological inhibitors that inhibit the activation of MEK by Ang II revealed that phosphorylation of p65 on serine 536 did not require the MEK-ERK-RSK signaling pathway. On the other hand, specifically targeting the IKK $\beta$  subunit of the IKK complex by overexpression of a dominant negative version of IKK $\beta$  (IKK $\beta$  K44A) or silencing RNA technology demonstrated that the IKK $\beta$  subunit of the IKK complex was responsible for the detected phosphoserine 536 signal in Ang II-treated cells. Characterization of the signaling pathway leading to activation of the IKK complex by Ang II revealed that neither epidermal growth factor receptor transactivation nor the phosphatidylinositol-3 kinase-AKT signaling cascade were involved. Collectively, our data demonstrate that the proinflammatory activity of Ang II is independent of the classical pathway leading to I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and degradation but clearly depends on the recruitment of an IKK complex signaling cascade leading to phosphorylation of p65 on serine 536.

## Introduction

Hypertension is a classical risk factor for the development of atherosclerosis (for review see [1]). Epidemiological studies showed that among hypertensive patients, those who have an activated renin-angiotensin (RAS) have a higher incidence of myocardial infarction than other forms of hypertension [2-6]. The octapeptide angiotensin II (Ang II) is the multifunctional effector of the RAS. It binds to two distinct receptor subtypes, designated AT1 and AT2 [7]. Most of the known effects of Ang II are relayed through binding of the AT1 subtype and studies in models of vascular injury have demonstrated that blockade of the RAS or gene disruption of the AT1 receptor can prevent the development of atherosclerosis [8-12]. In addition to its vasoconstrictive role, Ang II may also acts locally as a growth factor. Indeed, it is a hypertrophic factor for vascular smooth muscle cells (VSMC) and cardiac myocytes and has mitogenic effects for different cell type such as cardiac fibroblasts (for review see [13-15]). Interestingly, other studies have demonstrated that Ang II has proinflammatory actions by promoting an increase in the expression level of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and several chemokines such as monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES), interleukin (IL)-8, IL-6 and interferon-gamma- inducible protein 10 (IP-10) (for reviews see [16, 17]). However, the molecular understanding of the proinflammatory action of Ang II is still unclear.

Activation of the Ang II AT1 receptor (AT1R) in VSMC is functionally link to the recruitment and activation of cytosolic kinases such as the classical Ras/mitogen-activated protein kinase kinase-1 (MEK1)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)/ribosomal S6 kinase (RSK), protein kinases C (PKCs), calmodulin (CAM) kinases and Janus kinases (JAKs). These kinases can in turn lead to the activation of transcription factors involved in genes regulation and the growth promoting effect of Ang II [15, 18]. The transcription factor nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is a key regulator of inflammation, immune response, and

cellular survival [19] and the proinflammatory actions of Ang II have been attributed to its activation [16, 20-26].

The NF- $\kappa$ B family is represented by five members: p50, p65(RelA), c-Rel, p52, and RelB. In resting cells, they exist as homo- or heterodimers that are sequestered in the cytoplasm in an inactive form through their association with one of several inhibitory molecules, namely I $\kappa$ B- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\epsilon$ , p105, and p100. These inhibitors mask the nuclear localization sequence (NLS) in the rel homology domain (RHD) of NF- $\kappa$ B, thereby preventing it from accumulating in the nucleus (for recent reviews see [27, 28]). I $\kappa$ B $\alpha$  is the most characterized member of this family. It is composed of three domains: an N-terminal signal responsive domain, a central ankyrin repeat domain that interacts with NF- $\kappa$ B and a C-terminal PEST domain which is responsible for the basal turnover of the protein [29]. In the classical pathway, the first phase of NF- $\kappa$ B activation mainly consists of the regulated degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  and is triggered by prototypical activators such as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , lipopolysaccharide (LPS), IL-1 $\beta$  and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). These stimuli induce the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  at Ser-32 and Ser-36 in the N-terminal signal responsive domain by the canonical I $\kappa$ B kinase (IKK) complex, which is composed of two catalytic subunits called IKK $\alpha$  and  $\beta$  and one regulatory subunit IKK $\gamma$ . Phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  is subsequently polyubiquitinated and targeted to the 26S proteasome complex, resulting in the release and nuclear accumulation of NF- $\kappa$ B, which can now stimulate target gene transcription. Studies report that Ang II can stimulate degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ , but the decrease in its expression level is very small suggesting the existence of other pathways to regulate NF- $\kappa$ B activity [24, 26].

Notably, several lines of evidence suggest the existence of a second phase of NF- $\kappa$ B activation. Part of this second phase involves phosphorylation of the p65 subunit, which plays a key role in determining both the strength and duration of the NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional response (for recent reviews see [30, 31]). The sites of phosphorylation



reported to date are Ser-276 and Ser-311 in RHD and three phosphoacceptor sites located in the transactivation domain (TAD), Ser 468, Ser-529 and Ser-536. Several candidate kinases that phosphorylate each serine residue have been identified, such as protein kinase A and mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) for Ser-276 [32, 33], PKC $\zeta$  for Ser-311, GSK-3 $\beta$  for Ser-468, casein kinase II (CKII) for Ser-529 [34], and IKK $\alpha/\beta$  as well as RSK for Ser-536 [35-37]. Importantly, phosphorylation at Ser-536 was recently shown to reduce the ability of p65 to bind I $\kappa$ B $\alpha$  [36] and to allow the recruitment of TAFII31, a component of the basal transcriptional machinery [37]. Phosphorylation at Ser-536 is also responsible for recruitment of coactivators such as p300 [38] and also triggers its rapid turnover in the nucleus [39]. All these evidences support the importance of p65 phosphorylation at Ser-536 in the function of NF- $\kappa$ B. Notably, a recent study proposed that Ang II induces NF- $\kappa$ B through a RSK-dependent pathway leading to Ser-536 phosphorylation of p65 [40]. In the light of these interesting findings, we have set up experiments to identify more precisely the molecular mechanism by which Ang II induces proinflammatory action in VSMC and now describe a series of studies dissecting the novel mechanism by which Ang II activates NF- $\kappa$ B. We show that following binding to the AT1R, Ang II leads to an increase in the phosphotransferase activity of the IKK complex, which leads to phosphorylation of p65 on Ser-536. Because I $\kappa$ B $\alpha$  is not degraded in response to Ang II, we propose a model where it is the phosphorylation of p65 on Ser-536 that is likely to be involved in the pro-inflammatory actions of Ang II in VSMC.

## Experimental procedures

### *Reagent, antibodies, and plasmids*

Angiotensin II (Ang II) was purchased from Hubakel Scientific (St. Laurent, QC). EGF and TNF- $\alpha$  were from BioSource (Camarillo, CA). The tyrphostin AG1478, a selective EGFR kinase inhibitor, the PI3-kinase inhibitor LY294002, the MEK1/2 inhibitors UO126 and PD98059 were all from Biomol (Plymouth Meeting, PA). G418 was from Invitrogen. Commercial antibodies were from the following suppliers: anti-IKK $\gamma$  (SC-8330), anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (SC-371), anti-p65 (SC-372) and anti-IKK $\alpha$  (SC-7218) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti- $\beta$ -actin clone AC-74 (A5316) was from Sigma (Saint Louis, MO); anti-IKK $\beta$  antibody, phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32) antibody (#9241), phospho-AKT (Ser473) antibody (#9271), phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204) antibody (#9101), phospho-p65 (Ser536) antibody (#3031), and phospho-RSK (Ser380) antibody (#9341) were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA); anti-phosphotyrosine, clone 4G10 and anti-Lamin A/C were from Upstate cell signaling solution (Lake Placid, NY). An antibody that recognizes both p105 and p50 was a generous gift of Dr. John Hiscott (McGill University, Montreal, Qc). Glutathione-S-transferase (GST)-I $\kappa$ B $\alpha$  (1-54) has been described [41]. GST-p65 (354-551) was produced by subcloning PCR-amplified fragments in pGEX-KG. The resulting construct were transformed in *Escherichia coli* and following isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction (1 mM for 3 h at 37°C), purified over a glutathione agarose column (Amersham). The expression plasmids pTrack-Flag-IKK $\beta$  (K44A) and pCDNA3.1-HA-AT1R were provided by Drs. John Hiscott and Stephane Laporte (McGill University, Montreal, Qc) respectively.

### *Cell types and Transfection*

Rat VSMC and VSMC overexpressing a dominant-negative version of EGFR (HERCD533) [42] were obtained from Dr. Sylvain Meloche (University of Montreal,

Montreal, Qc) and grown in low glucose DMEM supplemented with 10% calf serum, 2 mM-glutamine, and antibiotics (50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air, 5% CO. All experiments were conducted on cells at passage levels 9-14. Quiescent VSMC were obtained by incubation of 95% confluent cell cultures in serum-free DMEM-Ham's F-12 (1:1) supplemented with 15 mM Hepes (pH 7.4), 0.1% bovine serum albumin, and 5 µg/ml transferrin for 48 h. For experiments with pharmacological inhibitors, the cells were treated with vehicle alone or with the indicated concentrations of inhibitors for 30 min before addition of Ang II. 293T cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC), cultured in minimal essential medium containing 10% fetal bovine serum and transfected using calcium phosphate coprecipitation method. All cells tested negative for mycoplasma contamination.

#### *Small Interfering RNA (siRNA)*

Two 21-nucleotide siRNA duplexes with 2-nucleotide (2'-deoxy)-thymidine 3' overhangs were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO) and directed against rat IKKβ: IKKβ#1 (nucleotide 1460 to 1478 (AAACCAGCATCCAGATTGA)) and IKKβ#2 (nucleotide 2028 to 2046 (GAATGTGTCTCGACTTAGT)). A siCONTROL Non-targeting silencing RNA (siRNA) (#D-001210-01-20) as described previously [41]. For transfection, cells were trypsinized and seeded into six-well plates ( $8.0 \times 10^5$  cells/well) without antibiotics. After 24h, cells were transfected with siRNA using Lipofectamine2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications. siRNA were used at a concentration of 120 nM in transfections. Cells were harvested for analysis 72 h after transfection.

#### *Retrovector construction, transduction and generation of rat VSMC overexpressing IκBα2NΔ4*

The pMSCVneo IκBα2NΔ4 retrovector was a kind gift of Dr. John Hiscott (McGill University) and has been described [43]. The Phoenix Amphotropic packaging cell line was

transiently transfected with the plasmids pMSCVneo and pMSCVneo I $\kappa$ B $\alpha$ 2N $\Delta$ 4. At 48 h post-transfection, retrovirus-containing medium was harvested and used to infect rat VSMC. VSMC were infected twice at 24 h intervals in the presence of 10  $\mu$ g/ml of polybrene (Sigma); selection with 800  $\mu$ g/ml of G418 (Invitrogen) was started 5 days later. After 14 days, a population of resistant VSMC was selected. For selection of clones from both rat VSMC (Neo) and rat VSMC (I $\kappa$ B $\alpha$ 2N $\Delta$ 4), cloning rings were used and expression of the transgene was verified by immunoblot analysis.

#### *RT-PCR analysis*

Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen). DNase-treated (Ambion, Austin, TX) cellular RNA (1  $\mu$ g) was reverse transcribed with AMV reverse transcriptase (Sigma) in a 20  $\mu$ l reaction volume according to manufacturer's instructions. PCRs were subsequently performed per the manufacturer's specifications with the following primers: rat *IL-6* forward and reverse, 5'-TGTTGTTGACAGCCACTGC-3' and 5'-TTTCAAGATGAGTTGGATGGTC-3' respectively; rat *MCP-1* forward and reverse, 5'-CAGGTCTCTGTCACGCTTCT-3' and 5'-AGTATTCATGGAAGGGAATAG-3' respectively and rat RPL32 forward and reverse, 5'-GTGAAGCCCAAGATCGTC-3' and 5'-GAACACAAAACAGGCACAC -3' respectively. PCR were performed using the following schedule: denaturation, annealing, and primer extension at 94, 56, and 72°C for 1 min, 1 min and 2 min respectively for 30 cycles. PCR products were electrophoresed on 1.2% agarose gels containing ethidium bromide and visualized using a gel documentation device (Typhoon scanner 9410)

#### *Immunoblot analysis*

After the different treatment, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and whole cell extracts were prepared using Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 50 mM sodium fluoride, 5 mM EDTA, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 10<sup>-4</sup>M phenylmethylsulfonyl fluoride, 10<sup>-6</sup>M leupeptin, 10<sup>-6</sup>M pepstatin A, 1% Triton X-100) for 30 min at 4°C. Lysates were

clarified by centrifugation at 13,000 g for 10 min and equal amounts of lysate proteins (30-75  $\mu$ g) were subjected to electrophoresis on 7.5, 10 or 12 % acrylamide gels. Proteins were electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham) in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and fixed for 10 min in methanol/acetic acid/glycerol (40:7:3). Immunoblot analysis of I $\kappa$ B $\alpha$  and b-actin were accomplished as described previously [41]. Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32), phospho-AKT (Ser473), phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204), phospho-p65 (Ser536), and phospho-RSK (Ser380) were used following manufacturer's instructions. Both anti-p65 and anti-IKK $\beta$  were used at 1 $\mu$ g/ml. Rabbit anti-p105/p50 and mAb 4G10 were used at 1:1000 and 1:5000 respectively.

#### *In vitro kinase assays*

The phosphotransferase activity of the IKK complex was measured as described previously [41]. Briefly, 250 to 400  $\mu$ g of whole cell extracts were incubated for 4 hours at 4°C with specific antibody to IKK $\gamma$  (anti-IKK $\gamma$  (SC-8330)) preabsorbed to protein-A-sepharose beads. The immune complexes were washed three times with lysis buffer and once with kinase buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, and 2 mM dithiothreitol (DTT)). IKK complex activities was assayed by resuspending the beads in 40  $\mu$ l of kinase buffer containing 1  $\mu$ g of GST-substrates (GST-I $\kappa$ B $\alpha$  or GST-p65) as indicated, 20  $\mu$ M ATP, and 20 $\mu$ Ci of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. The reactions were incubated at 30°C for 30 min. and stopped by the addition of 5X Laemmli's sample buffer. The samples were analyzed by SDS-gel electrophoresis. Following Coomassie staining, the gels were dried and exposed to a Gel Documentation device (Typhoon scanner 9410, Amersham) for imaging and quantification. In some experiments, the upper part of the gel was electrophoretically transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes and immunoprecipitated IKK complex was revealed by immunoblotting.

### *Phosphorous 32 labeling and Immunoprecipitation*

Quiescent VSMC in 100-mm petri dishes were metabolically labeled for 5 h at 37°C in bicarbonate and phosphate-free Hepes-buffered Dulbecco's modified Eagle's medium containing 0.75 mCi/ml [<sup>32</sup>P]phosphoric acid. The cells were then stimulated by the addition of 100 nM Ang II or 20 ng/ml TNF- $\alpha$  to the medium for the indicated period of time. Following a quick wash with ice-cold PBS, whole cell extracts were prepared as described above and precleared for 1 h with 10  $\mu$ l of normal rabbit serum and incubated for 4 h at 4°C with anti-p65 antibody preabsorbed to protein A-Sepharose beads. Immune complex were washed six times with lysis buffer. Protein complexes were eluted by heating at 95°C for 5 min in denaturing sample buffer and analyzed by SDS-gel electrophoresis on 10% acrylamide gels. The proteins were then electrophoretically transferred to PVDF membranes (Millipore) in 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% methanol, and exposed to a gel documentation device (Typhoon scanner 9410, Amersham Biosciences) for imaging and quantification. The membranes were after use in immunoblotting experiments using anti-p65 antibody to verify the immunoprecipitated p65.

### *Biosynthetic Labeling Experiments*

To examine the turnover of I $\kappa$ B $\alpha$  protein, quiescent VSMC in 100-mm Petri dishes were pulse-labeled for 1 h with 166  $\mu$ Ci/ml of [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine and then chased for the indicated times in serum-free medium containing excess methionine and cysteine and either Ang II or TNF- $\alpha$ . The cells were then washed twice with ice-cold PBS and lysed in Triton X-100 lysis buffer. Lysates (500  $\mu$ g protein) were precleared for 1 h with 5  $\mu$ l of normal rabbit serum and the resulting supernatants were incubated with protein A-Sepharose beads preabsorbed with 2  $\mu$ g of anti-I $\kappa$ B $\alpha$  for 4 h at 4°C. Immune complexes were washed five times with Triton X-100 lysis buffer. Proteins were eluted by heating at 95°C for 5 min in denaturing sample buffer and analyzed by SDS-gel electrophoresis on 12% acrylamide gels. The I $\kappa$ B $\alpha$  protein was detected by fluorography and visualized using a gel documentation device (Typhoon scanner 9410, Amersham Biosciences).

*Electromobility shift assays (EMSA)*

Preparation of cytosolic and nuclear extracts as well as EMSA was accomplished as described previously [44].

## Results

### *NF- $\kappa$ B-dependent chemokines gene induction by Ang II in VSMC*

Since controversy exist in the literature as to know whether Ang II has the ability to activate NF- $\kappa$ B transcription factor [45, 46], we first verified the state of activation of known NF- $\kappa$ B-regulated chemokines, namely IL-6 and MCP-1, in VSMC stably overexpressing the superrepressor version of I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\alpha$ 2N $\Delta$ 4. This mutant molecule has been shown to abrogate totally NF- $\kappa$ B induction by different stimuli. It involves mutation of the I $\kappa$ B $\alpha$  serine phosphorylation sites to alanine (Ser32/36Ala) and removal of the C-terminal PEST domain to generate a form of I $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ 2N $\Delta$ 4). The basal turnover of this mutated I $\kappa$ B is diminished but most importantly, I $\kappa$ B $\alpha$ 2N $\Delta$ 4 is no longer responsive to inducer-mediated phosphorylation and degradation, and thus acts as a transdominant repressor of the NF- $\kappa$ B pathway (by sequestering NF- $\kappa$ B subunits in the cytoplasm) [43]. Following selection of the stable transfectant, clones were isolated and analyzed for the transgene expression in western blot analysis (see Fig. 1A). Note that when the level of I $\kappa$ B $\alpha$ 2N $\Delta$ 4 is high, the expression of endogenous I $\kappa$ B $\alpha$  is diminished due to the fact that the I $\kappa$ B gene is itself regulated by NF- $\kappa$ B transcription factor (Fig. 1A, compare clones I $\kappa$ B $\alpha$ 2N $\Delta$ 4 #1 with #4). This illustrates that overexpression of I $\kappa$ B $\alpha$ 2N $\Delta$ 4 titrates out any free NF- $\kappa$ B subunits thus allowing reduction in basal NF- $\kappa$ B transcription of target genes such as I $\kappa$ B $\alpha$ . Following Ang II stimulation, induction of both *MCP-1* and *IL-6* transcripts was observed in the two clones of rat VSMC expressing only the neomycin cassette (clones neo #3 and #6). However, the presence of high level of I $\kappa$ B $\alpha$ 2N $\Delta$ 4 in clone #4 strongly abrogated the induction of these transcripts by Ang II (Fig. 1B). The clone expressing moderate level of I $\kappa$ B $\alpha$ 2N $\Delta$ 4 (clone#1) had an intermediate effect on the induction of *IL-6* and *MCP-1*. Together, these data clearly demonstrate a role of NF- $\kappa$ B in Ang II-induced proinflammatory genes in VSMC.



### ***IKK complex activation by Ang II in VSMC***

Given the essential role of the IKK in the activation of NF- $\kappa$ B, we next verified the phosphotransferase activity of this complex when VSMC were exposed to Ang II. Following immunoprecipitation of the scaffolding protein of the IKK complex, IKK $\gamma$ , we observed that Ang II treatment of VSMC resulted in a time-dependent (Fig. 2A) and dose-dependent (Fig. 2B) stimulation of the IKK complex as observed by an increase phosphotransferase activity towards the in vitro substrate GST-I $\kappa$ B $\alpha$ . The maximal increase in the phosphotransferase was observed at 1  $\mu$ M Ang II and sustained for at least 60 minutes starting at 1 min. post stimulation (Fig. 2A and 2B). Importantly, the observed IKK complex stimulation was completely abrogated when cells were pre-incubated with the AT1 antagonist Irbezartan demonstrating that the activation of the IKK complex by Ang II is AT1R-dependent (Fig. 2B). The use of the recombinant protein GST-I $\kappa$ B $\alpha$ 2N, where Ser-32 and 36 were mutated to alanine, showed no phosphorylation under our conditions thus confirming the specificity of the immunoprecipitated IKK complex in VSMC (Fig. 2C).

### ***Nonclassical activation of NF- $\kappa$ B by Ang II in VSMC***

Through phosphorylation-dependent degradation of I $\kappa$ B proteins by the proteasome, activation of the IKK complex is a rate-limiting step in the activation of NF- $\kappa$ B transcription factor [27, 47]. Notably, several groups have published data showing that Ang II induces weak or strong degradation of I $\kappa$ B proteins in VSMC [22, 24]. However, another recent study reported no degradation of the I $\kappa$ B $\alpha$ / $\beta$  NF- $\kappa$ B inhibitors in the same model exposed to Ang II [40]. Given that we observed a significant increase in the phosphotransferase activity of the IKK complex in VSMC stimulated with Ang II (Fig. 2), we wanted to revisit the possibility that the expression level of I $\kappa$ B proteins might be reduced following Ang II treatment. Western blot analysis clearly demonstrated no degradation of the two NF- $\kappa$ B inhibitors, I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$ , nor phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  on Ser 32 when cells were exposed to Ang II (see Fig. 3A, panels a, b and c) as opposed to

TNF- $\alpha$ -treated cells where a specific I $\kappa$ B $\alpha$  phosphoserine 32 signal was observed after 5 min of stimulation (Fig. 3A, panel b, lanes 11-12) followed by a net decrease of I $\kappa$ B $\alpha$  isoform after 10 min (Fig. 3A, panel a, lane 12). To confirm this observation, we next determined the rate of I $\kappa$ B $\alpha$  turnover by pulse-chase experiments on VSMC treated with Ang II and TNF- $\alpha$ . When compared to untreated cells, stimulation of cells with Ang II did not affect the stability of I $\kappa$ B $\alpha$ , as opposed to stimulation with TNF- $\alpha$  where 90% of NF- $\kappa$ B inhibitor was degraded after 15 min of treatment (Fig. 3B). Albeit the lack of I $\kappa$ B $\alpha$  degradation by Ang II, we observed a significant DNA binding activity of p50/p65 heterodimers in VSMC (see Supplemental Data, Fig. 1). Ang II has pleiotropic actions at multiple points in the NF- $\kappa$ B activation pathway in VSMC. Reports have indeed demonstrated that Ang II could lead to NF- $\kappa$ B activation through an increased processing of p105 to p50 [24], which is considered to be a constitutive process [27]. In addition, Ang II induces tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  in fetal VSMC [48], a process thought to promote its physical dissociation from NF- $\kappa$ B. However, our own immunoprecipitation studies and Western blot analysis clearly demonstrated no tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  when VSMC were exposed to Ang II as opposed to pervanadate treatment (see Supplemental Data, Fig. 2A). No processing of p105 to p50 was also observed over a 16 hours period treatment with Ang II (see Supplemental Data, Fig. 2B). Collectively, these data demonstrate that, albeit a significant activation of the IKK complex by Ang II and the increase in DNA binding activity of p65/p50 complexes, the classical pathway leading to degradation of I $\kappa$ B proteins and atypical models of activation (tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  and p105 processing), are not involved in Ang II-induced activation of NF- $\kappa$ B transcription factor.

***Ang II induces phosphorylation of p65 on Ser-536 in an IKK-dependent manner***

In addition to I $\kappa$ B proteins, it is now well recognized that components of the IKK complex have several other substrates including histone H3, p100 and p65. Whereas p65 is a substrate for IKK $\alpha$  and  $\beta$  (for recent reviews see [30, 31]), histone H3 and p100 are

phosphorylated only by IKK $\alpha$  [47, 49, 50]. Since we observed a significant activation of the IKK complex by Ang II, we next analyzed the phosphorylation state of p65 after immunoprecipitation from  $^{32}$ P-labeled VSMC stimulated with Ang II or TNF- $\alpha$ . p65 is expressed as a phosphoprotein in quiescent VSMC (Fig. 4A lane 1) and exposure to Ang II or TNF- $\alpha$  significantly increased its phosphorylation level (Fig. 4A). Using a phosphospecific antibody, we next addressed if p65 phosphorylation was occurring on an IKK phosphorylation site, namely Ser-536. A specific phosphoserine 536 signal was detected when cells were exposed to Ang II (Fig. 4B, panel a). Interestingly, a treatment of 15 min with another growth factor for VSMC, epidermal growth factor (EGF), which like Ang II induces the activation of AKT and ERK (see Fig. 4B, panels c and d, lane 6), failed to induce phosphorylation of p65 on Ser-536 thus demonstrating the specificity of the signaling cascades activated by Ang II and leading to p65 phosphorylation in VSMC. In addition to IKK $\alpha$  and  $\beta$ , RSK1 was recently shown to target Ser-536 of p65 [36]. Since Ang II is a strong activator of the MEK-ERK-RSK signaling cascade in VSMC, we first verified if RSK was recruited by Ang II to induce phosphorylation of p65 on Ser-536. The use of pharmacological inhibitors that target specifically MEK1/2, namely PD98059 and UO126, completely abrogated Ang II-induced RSK1 activation in VSMC without affecting the specific phosphoserine 536 signal (Fig. 5A). Inhibition of the MEK-ERK-RSK signaling cascade for up to 1 h did not prevent the rapid induction neither the sustained phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II (Fig. 5B). In order to verify the possible role of the IKK complex in Ang II-induced p65 phosphorylation on Ser-536, we next verified if the activation of the IKK complex followed a kinetic similar to the phosphoserine 536 signal. A detailed kinetics in VSMC revealed that the activation of the IKK complex by Ang II was rapid and sustained for at least 24 hours (Fig. 5C panel a). Interestingly, the activation of the IKK complex followed the same kinetic of phosphorylation of p65 on Ser-536 (Fig. 5C, panel c). As predicted, stimulation of the IKK complex by Ang II also resulted in an increase phosphotransferase activity towards the in vitro substrate GST-p65 (354-551) (see Supplemental Data, Fig. 3). Since IKK-induced p65 phosphorylation was previously shown to occur in the cytoplasm [51, 52], we next addressed in which cellular

compartments phosphorylation of p65 occurred in Ang II-treated cells. Figure 5D shows the presence of a strong inducible phosphoserine 536 signal that was predominantly detected in the cytoplasmic compartment. Interestingly, a significant amount was also observed in the nucleus. To further substantiate the hypothesis of a possible involvement of the IKK complex in Ang II-mediated p65 phosphorylation, we took advantage of a point mutant version of IKK $\beta$  (IKK $\beta$  K44A), which lacks the ATP binding site and therefore acts in a dominant negative fashion. When co-expressed with the AT1R in 293T cells, it totally prevented the phosphorylation of p65 by Ang II (Fig. 5E). In order to directly ask whether the IKK $\beta$  subunit of the IKK complex was responsible for the detected p65 phosphoserine 536 signal in Ang II-treated cells, we next used RNA silencing technology. Upon transfection of the indicated siRNA duplexes, the expression levels of IKK $\beta$  was down regulated by 90% and correlated with a net decrease of the phosphoserine 536 signal in Ang II-treated cells (Fig. 5F). Silencing IKK $\beta$  in VSMC did not however affect the phosphorylation of the ERK isoforms by Ang II. Altogether, these data demonstrate that the IKK $\beta$  subunit of the IKK complex plays an essential role in Ser-536 phosphorylation of p65 by Ang II.

IKK $\beta$  is a cytoplasmic kinase and the above results suggest that it is the cytoplasmic phosphorylation of p65 that trigger its nuclear accumulation possibly through a process involving loss of affinity for I $\kappa$ B $\alpha$  without the requirement for its degradation [36]. Consequently, to further substantiate the hypothesis of a dispensable role of the I $\kappa$ B inhibitors in Ang II-induced nuclear accumulation of phosphorylated p65, VSMC were pre-treated with the proteasome inhibitor MG-132 and again a significant amount of phosphorylated p65 was found in the nucleus of Ang II-treated cells (see Supplemental Data Fig. 4).

***Molecular characterization of AT1 receptor signaling to the IKK complex***

Since we observed an important role of the IKK complex in the proinflammatory actions of Ang II, we next wanted to verify what might be the signaling pathways coupling the AT1R to the IKK complex. Using pharmacological as well as molecular approaches, we address the roles of the EGF receptor and the PI3-kinase-AKT pathway in Ang II-mediated IKK complex activation in VSMC. Figure 6A shows that pretreatment with the tyrphostin AG1478, a selective EGFR kinase inhibitor that efficiently block the activation of ERK1 by Ang II ([41] and data not shown), did not antagonize the activation of the IKK complex. This observation is in agreement with an activation of the phosphotransferase activity of the IKK complex in rat VSMC overexpressing a dominant-negative version of EGFR (HERCD533) [42] (Fig. 6B). Inhibition of the PI3-kinase pathway by the use the specific inhibitor LY294002 inhibited activation of AKT by Ang II (data nor shown) but was also without any consequence on Ang II-induced activation of the IKK complex in VSMC (Fig. 6C). Together, these data show that AT1R-mediated transactivation of the EGFR and the PI3-kinase-AKT pathway are not involved in the induction of the IKK complex by Ang II in VSMC.

## Discussion

After primary injury of the vasculature, the inflammation response that follows is characterized by three key events: 1) increment of vascular permeability, 2) infiltration of inflammatory cells and 3) tissue repair and remodeling (for review see [16]). Through the induction of a repertoire of NF- $\kappa$ B-regulated genes such as, IL-6, MCP-1, IL-8, RANTES, VCAM-1, and ICAM-1, it is now well appreciated that Ang II participates in these key events of the inflammatory response leading to the development of cardiovascular diseases like atherosclerosis [16]. Whereas the pathways leading to NF- $\kappa$ B activation following treatment with prototypical activators such as TNF- $\alpha$ , LPS or IL-1 $\beta$  is well characterized, the molecular understanding of the signaling pathways that is involved in the coupling of G protein-coupled receptors (GPCR) such as AT1R or AT2R to NF- $\kappa$ B are still unclear. The results presented in this report show that Ang II activates NF- $\kappa$ B in cultured VSMC, and that, independently of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and I $\kappa$ B  $\alpha/\beta$  degradation (see Fig. 3). These observations strongly suggest that the classical pathway of NF- $\kappa$ B activation is not triggered by Ang II in VSMC. Moreover, other mechanisms described as being responsible for Ang II-induced NF- $\kappa$ B activation, namely p105 processing and tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  [24, 48], are not observed in Ang II-treated VSMC. Instead, we now propose a new model where Ang II treatment leads to an AT1R-dependent activation of the IKK complex. The activated IKK complex then phosphorylates Ser-536 of p65 (see Fig. 7 for the detailed mechanism). The extent to which the present mechanism can account for the known pro-inflammatory action of Ang II in the cardiovascular system is unknown at the moment as other transcription factors are also involved in the pro-inflammatory action of the peptide such as CREB and AP-1 (ATF-2/c-Jun) [53, 54]. However, p65 phosphorylation on Ser-536 has also been observed in Ang II-treated cultured adipocytes as well as in pressure-dependent activation of NF- $\kappa$ B in arterial segments [55, 56]. Thus, a possible molecular link may exist between two known risk factors for the development of

atherosclerosis, namely obesity and hypertension, for the activation of NF- $\kappa$ B through p65 phosphorylation.

### ***No degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ in Ang II-treated VSMC***

Many studies have looked at I $\kappa$ Bs degradation when VSMC are exposed to Ang II. Intriguingly, no studies have addressed if the canonical IKK complex was activated by Ang II. Using in vitro kinase assays, our report clearly demonstrates a rapid and sustained phosphotransferase activity of the IKK complex, which was mediated by the AT1R and dependent on the concentration of Ang II used (see Figs. 2 and 5C). In response to prototypical activators of NF- $\kappa$ B, activation of the IKK complex normally leads to phosphorylation and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . Why then Ang II does not induce the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ ? One possible scenario that might account for this observation is the recent observation demonstrating recruitment of  $\beta$ -arrestin proteins to I $\kappa$ B $\alpha$  when cells are exposed to  $\beta$ 2 adrenergic receptors [57, 58]. Interestingly, this association between  $\beta$ -arrestin proteins and I $\kappa$ B $\alpha$  was shown to abrogate TNF- $\alpha$ -induced I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and degradation [57]. Thus, experiments are underway to try to verify if the stimulation of VSMC with Ang II promotes the recruitment of  $\beta$ -arrestin proteins to I $\kappa$ B $\alpha$ , a process that could explain the incapacity of Ang II to induce the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ .

### ***Phosphorylation of p65 by IKK $\beta$***

A recent report by Zhang and colleagues demonstrated phosphorylation of p65 on Ser-536 in VSMC exposed to Ang II [40]. Using the MEK 1/2 inhibitor U0126 as well as silencing RNA technology, they suggested that this was essentially occurring in a RSK-dependent manner. However, several observations from our study suggest a more important contribution of the IKK complex in this process. First, our study clearly shows that the two MEK 1/2 inhibitors PD98059 and U0126, significantly abrogated the activation of RSK by Ang II without affecting the phosphoserine 536 signal (Fig. 5A and B). Second, the kinetic of the IKK complex activation follows the same kinetic as p65 Ser-536 phosphorylation

(Fig. 5C). Third, it was shown that IKK $\beta$ -dependent phosphorylation of Ser-536 of p65 occurs in the cytoplasm [51, 52], similar to what we observed in Ang II-treated cells (Fig. 5D), whereas RSK-dependent phosphorylation of p65 happens exclusively in the nuclear compartment [36]. Fourth, overexpression of a dominant negative version of IKK $\beta$  completely abrogated Ang II-induced phosphorylation of p65 on Ser-536 in 293T cells expressing the AT1R (Fig. 5E). Fifth, downregulation of IKK $\beta$  expression by siRNA technology has allowed us to conclude that activation of the IKK complex is responsible for the detected phosphoserine 536 signal observed in Ang II-treated VSMC (Fig. 5F). We do not have an explanation for the difference between the report by Zhang and colleagues [40] and this study. Notably, the two MEK1/2 inhibitors UO126 and PD98059 had no effect on the phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II in VSMC derived from Sprague-Dawley or Wistar-Kyoto rats (data not shown).

#### ***Pleiotropic roles for the phosphorylation of p65 on Ser-536***

Although the exact roles of this covalent modification of p65 are not precisely characterized, it seems to affect several aspects of NF- $\kappa$ B signaling. Thus, Ser-536 phosphorylation of p65 has been implicated in many nuclear effects cumulating to activation of NF- $\kappa$ B target genes [37, 38]. Through an increased association of a phosphomimetic form of p65 with TAFII31 [37], and the role of this phosphoacceptor site in recruiting p300 [38], it has become clear that phosphorylation of p65 may play a major role in NF- $\kappa$ B-mediated transcriptional response. Ser-536 phosphorylation of p65 could also affect its ability to associate with I $\kappa$ B $\alpha$  inhibitor. Notably, p53 was recently reported to induce NF- $\kappa$ B activity without I $\kappa$ B $\alpha$  degradation [36] and a model has been proposed to explain the enhanced nuclear localization and increased DNA binding of NF- $\kappa$ B. In this model, p65 phosphorylated at Ser-536 loses its affinity of I $\kappa$ B $\alpha$  and alters the basal nucleocytoplasmic shuttling properties of the NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B $\alpha$  complex favoring nuclear retention. Based on this model, our data suggest that a subpopulation of p65 phosphorylated on Ser-536 loses their affinity for I $\kappa$ B $\alpha$  and accumulate into the nuclear compartment (see



Fig. 5D and Supplemental Data Fig. 4). Finally, phosphorylation of p65 on Ser-536 also triggers its rapid turnover in the nucleus [39]. Interestingly, we also noticed a prolonged nuclear signal of p65 phosphorylated on Ser-536 in the presence of MG132 (compare Figs. 5D and Supplemental Data Fig. 4). Thus, it is likely that the induction of phosphorylation of p65 by Ang II regulates the overall NF- $\kappa$ B response through both positive inputs (increase in nuclear accumulation and p65 transcriptional activity) as well as negative inputs (increase in p65 turnover).

#### ***AT1R coupling to the IKK complex***

The mechanisms by which GPCR are able to transduce a signal from the cellular environment into the cytoplasm have been studied for decades. Albeit the essential roles of heterotrimeric G proteins in this process, it has now become well appreciated that GPCR uses tyrosine kinase receptors in order to activate multiple signaling pathways, most of which influencing cell growth and surviving. Thus, for AT1R, it has been clearly established that transactivation of the EGFR is essential to activation of the Raf/MEK/ERK as well as PI3-kinase/PDK/AKT modules [42, 59, 60]. In addition to ERKs and AKT, activation of NF- $\kappa$ B is also linked to cellular growth and surviving, and with the observations that both PDK1 and AKT can act as IKK-activating kinases [61, 62], it was therefore important to address if EGFR transactivation and the PI3-kinase/PDK/AKT module were involved in the activation of the IKK complex by Ang II. A pharmacological approach using EGFR kinase and PI3-kinase inhibitors and a molecular approach using VSMC overexpressing a dominant negative version of EGFR have allowed us to conclude that neither EGFR transactivation nor the PI3-kinase pathway were involved in AT1R-mediated activation of the IKK complex.

In conclusion, our data suggest that AT1R is coupled to a nonclassical mode of activation of NF- $\kappa$ B in VSMC involving an IKKcomplex/p65 Ser-536 signaling cascades. Understanding the role of inflammation in atherosclerosis might pave the way for the development of new therapeutics to treat this cardiovascular disease such as IKK $\beta$

inhibitors [28]. While our paper was submitted, a related paper was published (Zhang, L., Cheng, J., Ma, Y., Thomas, W., Zhang, J., and Du, J. 2005. *Circ. Res.* Oct 13 ; Epub ahead of print), indicating a role of IKK $\beta$  in p65 phosphorylation by Ang II.

## **Acknowledgments**

We thanks Drs. Sylvain Meloche and John Hiscott for reagents used in this study. We thank also Dr. Guy Servant for helpful discussions.

## Bibliography

1. Maas, R. and R.H. Boger, *Old and new cardiovascular risk factors: from unresolved issues to new opportunities*. *Atheroscler Suppl*, 2003. **4**(4): p. 5-17.
2. Alderman, M.H., et al., *Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension*. *N. Engl. J. Med.*, 1991. **324**: p. 1098-1104.
3. Cambien, F., et al., *Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction*. *Nature*, 1992. **359**(6396): p. 641-4.
4. Meade, T.W., J.A. Cooper, and W.S. Peart, *Plasma renin activity and ischemic heart disease*. *N. Engl. J. Med.*, 1993. **329**: p. 616-619.
5. Alderman, M.H., *Plasma renin activity and coronary heart disease: are they related?* *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 1995. **4**: p. 201-203.
6. Kon, V. and K. Jabs, *Angiotensin in atherosclerosis*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2004. **13**(3): p. 291-7.
7. De Gasparo, M., et al., *International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II receptors*. *Pharmacol. Rev.*, 2000. **52**: p. 415-472.
8. Aberg, G. and P. Ferrer, *Effects of captopril on atherosclerosis in cynomolgus monkeys*. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1990. **15**: p. S65-S72.
9. Chobanian, A.V., et al., *Anti-atherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit*. *Hypertension*, 1990. **12**: p. 327-331.
10. Chobanian, A.V., et al., *Trandolapril inhibits atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit*. *Hypertension*, 1992. **20**: p. 473-477.
11. Furukawa, Y., et al., *Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 reduces graft coronary artery disease and prevent graft status in a murine model: a comparative study with captopril*. *Circulation*, 1996. **93**: p. 333-339.
12. Wassmann, S., et al., *Inhibition of Diet-Induced Atherosclerosis and Endothelial Dysfunction in Apolipoprotein E/Angiotensin II Type 1A Receptor Double-Knockout Mice*. *Circulation*, 2004.

13. Schelling, P., H. Fischer, and D. Ganten, J. Hypertens., 1991. **9**: p. 3-15.
14. Pratt, R.E. and V.J. Dzau, in *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*, M.K. Raizada, M.I. Phillips, and C. Sumners, Editors. 1993, CRC Press, Inc: Boca Raton. p. 471-483.
15. Meloche, S., S. Pelletier, and M.J. Servant, *Functional cross-talk between the cyclic AMP and Jak/STAT signaling pathways in vascular smooth muscle cells*. Mol Cell Biochem, 2000. **212**(1-2): p. 99-109.
16. Suzuki, Y., et al., *Inflammation and angiotensin II*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(6): p. 881-900.
17. Brasier, A.R., A. Recinos, 3rd, and M.S. Eledrisi, *Vascular inflammation and the renin-angiotensin system*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(8): p. 1257-66.
18. Griendling, K.K., et al., *Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts*. Hypertension, 1997. **29**(1 Pt 2): p. 366-73.
19. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6853-6866.
20. Kranzhofer, R., et al., *Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(7): p. 1623-9.
21. Ortego, M., et al., *Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells*. Atherosclerosis, 1999. **147**(2): p. 253-61.
22. Ruiz-Ortega, M., et al., *Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms*. Circ Res, 2000. **86**(12): p. 1266-72.
23. Funakoshi, Y., et al., *Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells*. Hypertension, 2001. **38**(1): p. 100-4.
24. Han, Y., M.S. Runge, and A.R. Brasier, *Angiotensin II induces interleukine-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappaB transcription factors*. Circulation Research, 1999. **84**: p. 695-703.

25. Pueyo, M.E., et al., *Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(3): p. 645-51.
26. Wolf, G., et al., *Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptors*. *Kidney Int*, 2002. **61**(6): p. 1986-95.
27. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. *Genes Dev*, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
28. Karin, M., Y. Yamamoto, and Q.M. Wang, *The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. **3**(1): p. 17-26.
29. Lin, R., et al., *Phosphorylation of Ikb $\alpha$  in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability*. *Mol.Cell.Biol.*, 1996. **16**: p. 1401-1409.
30. Chen, L.F. and W.C. Greene, *Shaping the nuclear action of NF-kappaB*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(5): p. 392-401.
31. Viatour, P., et al., *Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation*. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(1): p. 43-52.
32. Zhong, H., R.E. Voll, and S. Ghosh, *Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300*. *Mol Cell*, 1998. **1**(5): p. 661-71.
33. Vermeulen, L., et al., *Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1)*. *Embo J*, 2003. **22**(6): p. 1313-24.
34. Wang, D., et al., *Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(42): p. 32592-7.
35. Sakurai, H., et al., *IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(43): p. 30353-6.
36. Bohuslav, J., et al., *p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(25): p. 26115-25.
37. Buss, H., et al., *Constitutive and IL-1-inducible phosphorylation of p65 NF-kB at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , and*

- IKKepsilon, TBK1 and an unknown kinase and couples p65 to TAFII31-mediated IL-8 transcription.* J Biol Chem, 2004.
38. Chen, L.F., et al., *NF- $\kappa$ B RelA phosphorylation regulates RelA acetylation.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(18): p. 7966-75.
  39. Lawrence, T., et al., *IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation.* Nature, 2005. **434**(7037): p. 1138-43.
  40. Zhang, L., et al., *A new cellular signaling mechanism for angiotensin II activation of NF-kappaB: An IkappaB-independent, RSK-mediated phosphorylation of p65.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1148-53.
  41. Gravel, S.P. and M.J. Servant, *Roles of an IkappaB kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions.* J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7477-86.
  42. Voisin, L., et al., *EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors.* Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(2): p. C446-55.
  43. Kwon, H., et al., *Inducible expression of Ikb $\alpha$  repressor mutants interferes with NF-kB activity and HIV-1 replication in Jurkat T cells.* Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**: p. 7431-7440.
  44. Sun, Z., et al., *PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes.* Nature, 2000. **404**(6776): p. 402-7.
  45. Sano, M., et al., *ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts.* Circ Res, 2001. **89**(8): p. 661-9.
  46. Jiang, B., et al., *Angiotensin II differentially regulates interleukin-1-beta-inducible NO synthase (iNOS) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression: role of p38 MAPK.* J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20363-8.
  47. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.* Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.
  48. Wu, L., et al., *Regulation of inhibitory protein-kappaB and monocyte chemoattractant protein-1 by angiotensin II type 2 receptor-activated Src homology protein tyrosine phosphatase-1 in fetal vascular smooth muscle cells.* Mol Endocrinol, 2004. **18**(3): p. 666-78.

49. Anest, V., et al., *A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression*. Nature, 2003. **423**(6940): p. 659-63.
50. Yamamoto, Y., et al., *Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression*. Nature, 2003. **423**(6940): p. 655-9.
51. Sakurai, H., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36916-23.
52. Mattioli, I., et al., *Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6336-44.
53. Schmidt-Ott, K.M., S. Kagiya, and M.I. Phillips, *The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis*. Regul Pept, 2000. **93**(1-3): p. 65-77.
54. Funakoshi, Y., et al., *Induction of interleukin-6 expression by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells*. Hypertension, 1999. **34**(1): p. 118-25.
55. Lemarie, C.A., et al., *Pressure-induced vascular activation of nuclear factor-kappaB: role in cell survival*. Circ Res, 2003. **93**(3): p. 207-12.
56. Skurk, T., V. van Harmelen, and H. Hauner, *Angiotensin II stimulates the release of interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human adipocytes by activation of NF-kappaB*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(7): p. 1199-203.
57. Gao, H., et al., *Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways*. Mol Cell, 2004. **14**(3): p. 303-17.
58. Witherow, D.S., et al., *beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8603-7.
59. Eguchi, S. and T. Inagami, *Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase*. Regul Pept, 2000. **91**(1-3): p. 13-20.
60. Shah, B.H., et al., *Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs*. J Cell Physiol, 2006. **206**(1): p. 47-57.
61. Romashkova, J.A. and S.S. Makarov, *NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling*. Nature, 1999. **401**(6748): p. 86-90.

62. Tanaka, H., N. Fujita, and T. Tsuruo, *PDK1-mediated IKKbeta phosphorylation activates NF-kappa B signaling*. J Biol Chem, 2005.

## Footnotes

The abbreviations used are: Ang II, angiotensin II; I $\kappa$ B kinase, IKK; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted; IP-10, interferon-gamma-inducible protein 10; TBK1, Tank-binding kinase 1; GPCR, G protein-coupled receptor; EGFR, epidermal growth factor receptor; VSMC, vascular smooth muscle cells; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; EGF, epidermal growth factor, IL-6, interleukin-6; siRNA, silencing RNA; AT1R, Ang II AT1 receptor.

This work was supported by a research grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to M.S. M.S. is a recipient from a Rx&D/CIHR Health Research Foundation Career Awards in Health Sciences. P.M. is a CIHR scholar. A.D. and S.P.G are recipients of a studentship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J.F.C. holds a studentship from Rx&D/CIHR.



## Figure legends

**Figure 1. A NF- $\kappa$ B superrepressor antagonizes Ang II-induced *IL-6* transcription in VSMC.** **A)** Production of stable cell lines expressing NF- $\kappa$ B superrepressor. VSMC were infected with a retroviral construct expressing the NF- $\kappa$ B superrepressor (IkB $\alpha$  2N $\Delta$ 4) or encoding for the neomycin cassette only (Neo). Following selection of a stable population, clones were isolated and analyzed for the transgene expression by Western blot analysis. **B)** The expression of the NF- $\kappa$ B superrepressor significantly abrogates Ang II-induced *IL-6* transcription. Quiescent Neo and IkB $\alpha$  2N $\Delta$ 4 clones were stimulated for different times with 100 nM Ang II. Total RNA was isolated and subjected to RT-PCR analysis with primers directed against rat *IL-6* and *MCP-1* transcripts. Normalization was accomplished using primers against the *RPL32* house keeping gene.

**Figure 2. Activation of the canonical IKK complex in Ang II-treated VSMC.** **A)** Quiescent VSMC were stimulated with 100 nM Ang II for different times or with 20 ng/ml TNF- $\alpha$  for 10 min. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-IKK $\gamma$  antibody. The phosphotransferase activity of the immunoprecipitates was assayed as described in Experimental Procedures using GST-IkB $\alpha$  as substrate. After the kinase assay, reactions were run on SDS-gels, dried and exposed to the TYPHOON image analyzer for quantification. **B)** The activation of the IKK complex is dose-dependent and mediated by the AT1R. Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 1  $\mu$ M Irbezartan or 0.01% vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) and then stimulated with the indicated concentrations of Ang II for 5 min. Whole cell extracts were prepared and subjected to in vitro kinase assay as described in A. **C)** IKK complex in vitro kinase assay is specific for Ser32/36 of IkB $\alpha$ . Quiescent VSMC were stimulated for the indicated times with 100 nM Ang II. Whole cell extracts were prepared and the immunoprecipitated IKK complex was either incubated in the presence of GST-IkB $\alpha$  wt or GST-IkB $\alpha$  2N in which the two

phosphoacceptor sites were mutated to alanine. After the kinase assay, reactions were run on SDS-gels, dried and exposed to the TYPHOON image analyzer for quantification.

**Figure 3. Ang II does not lead to N-terminal phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  nor its degradation in VSMC.** **A)** Quiescent VSMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II or 20 ng/ml TNF- $\alpha$ . Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody (panel *a*), anti-phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32) antibody (panel *b*), and anti-I $\kappa$ B $\beta$  antibody (panel *c*). Normalization of the protein samples was conducted using anti- $\beta$ -actin antibody (panel *d*). **B)** Turnover of I $\kappa$ B $\alpha$ . Quiescent VSMC were pulse-labeled with [ $^{35}$ S]methionine/[ $^{35}$ S]cysteine for 60 min after which the medium was changed to fresh medium containing an excess of non-radiolabeled methionine/cysteine and 100 nM Ang II or 20 ng/ml TNF- $\alpha$ . At different times, cell extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody. After extensive washing, the immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on 12% acrylamide gels and analyzed by fluorography using a TYPHOON image analyzer.

**Figure 4. Ang II-induced rapid phosphorylation of p65 in VSMC.** **A)** *in vivo* phosphorylation of p65. Quiescent VSMC were pulse-labeled with [ $^{32}$ P] orthophosphate for 5 hours after which the labeled cells were stimulated with 100 nM Ang II or 20 ng/ml TNF- $\alpha$ . At different times, cells extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with anti-p65 antibody. After extensive washing, the immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on 10% acrylamide gels and transferred to a PVDF membrane. The membrane was then exposed to a gel documentation device for imaging and quantification (TY) or revealed by immunoblotting (IB) with an anti-p65 antibody to confirm equal amount of immunoprecipitated proteins. **B)** Ser-536 phosphorylation of p65 by Ang II. Quiescent VSMC were stimulated for the indicated times with 100 nM Ang II, 20 ng/ml TNF- $\alpha$  and 100 ng/ml EGF. Whole cell extracts were prepared and subjected to

immunoblotting analysis using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody (*a*), anti-p65 antibody (*b*), anti-phospho-AKT (Ser473) antibody (*c*), and anti-phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204) antibody (*d*). Membranes were stripped between each blotting experiment.

**Figure 5. Ang II-induced Ser-536 phosphorylation of p65 is dependent of IKK $\beta$ .** **A)** Pharmacological inhibition of MEK blocks RSK activation by Ang II but not phosphorylation of p65 on Ser-536. Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 30  $\mu$ M PD98049, 10  $\mu$ M U0126, or 0.01% DMSO and then stimulated with 100 nM Ang II for 10 min. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody (*upper panel*), anti-p65 antibody (*middle panel*), and anti-phospho-RSK (Ser380) antibody (*lower panel*). Membranes were stripped between each blotting experiment. **B)** Sustained inhibition of the MEK-ERK signaling cascade does not inhibit phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II. Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 10  $\mu$ M U0126, or 0.01% DMSO and then stimulated with 100 nM Ang II for the indicated times. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-p65 (Ser536) (panel *a*), anti-p65 (panel *b*), anti-phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204) (panel *c*) or anti-phospho-RSK (panel *d*) antibodies. **C)** The kinetic of Ser-536 phosphorylation of p65 paralleled the activation of the IKK complex. Quiescent VSMC were stimulated for the indicated times with Ang II. Whole cell extracts were prepared and subjected to IKK complex kinase assay (*a*) as described in Fig. 2. For immunoblotting (lower panel), the upper part of the gel was probed with an anti-IKK $\beta$  antibody to confirm equal amounts of the immunoprecipitated kinase complex (*b*). WCE were also analyzed by immunoblotting using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody (*c*) and anti-p65 antibody (*d*). Membranes were stripped between each blotting experiment. **D)** Ang II treatment leads to phosphorylation of p65 on Ser-536 in the cytoplasm. Quiescent VSMC were stimulated for the indicated periods of time with Ang II. Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared and analyzed by immunoblotting using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody and anti-p65. The purity of the nuclear fractions was demonstrated by the virtual exclusion of p105. Using a higher sensitivity setting on the documentation device allowed

us to better appreciate the presence of p65 phosphorylated on Ser-536 in the nucleus (lower right panel). **E)** Overexpression of a dominant negative version of IKK $\beta$  in 293T abrogates the phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II. 293T cells were cotransfected with AT1R in the presence of either pFlag-IKK $\beta$  (K44A) or the vector alone. 30h posttransfection, cells were incubated in serum free medium for the next 18h before stimulation with Ang II (100 nM) for the indicated periods of time. Whole cell extracts were prepared and subjected to immunoblot analysis using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody and anti-Flag antibody as indicated. **F)** Reducing the expression level of IKK $\beta$  inhibits the phosphorylation of p65 on Ser-536 by Ang II. VSMC were transfected with a siCONTROL non-targeting silencing RNA (Control) or two different RNA duplexes designed to specifically target IKK $\beta$  as indicated. 24 h post-transfection, cells were incubated in serum-free medium for 48 h and then stimulated with Ang II for the indicated time. Whole cell extracts were prepared and analyzed by immunoblotting using the indicated antibodies. Membranes were stripped between each blotting experiment.

**Figure 6. Activation of the IKK complex by Ang II is independent of EGFR transactivation and the PI3-kinase pathway.** **A)** Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 250 nM AG1478, or 0.01% DMSO and then stimulated for 10 min with 100 nM Ang II as indicated. In vitro IKK complex kinase assay was measured as described in Fig. 2. **B)** Quiescent parental (wt) and HERCD533 (mut) cells were stimulated with 100 nM Ang II for the indicated times and the phosphotransferase activity of the IKK complex was assayed as described above. **C)** Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 30  $\mu$ M LY294002, or 0.01% DMSO and then stimulated for 10 min with 100 nM Ang II. An IKK complex kinase assay was conducted as above.

**Figure 7. Proposed model for the activation of NF- $\kappa$ B by Ang II in VSMC.**

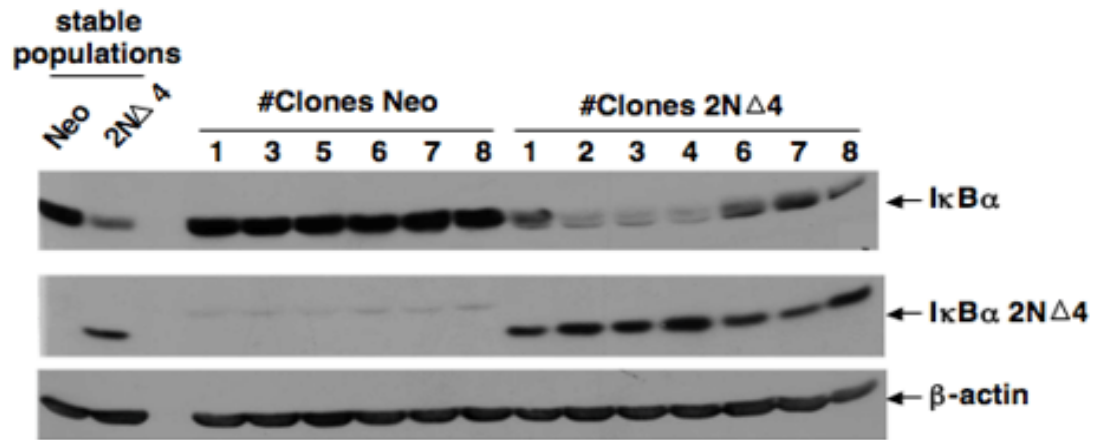
**Supplemental Data : Figure 1.** Increase DNA binding activity in VSMC exposed to Ang II. Quiescent VSMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II. Nuclear extracts were prepared and subjected to EMSA analysis. The use of an anti-p50 antibody supershifted (SS) whereas p65 antibody inhibited the formation of the specific NF- $\kappa$ B signal possibly by competing with the binding of the I $\kappa$ B probe to p65.

**Supplemental Data: Figure 2. A)** Ang II does not lead to phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  on tyrosine residues. Quiescent VSMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II or 0.5 mM pervanadate, a tyrosine phosphatase inhibitor. Whole cell extracts (500  $\mu$ g) were prepared and subjected to immunoprecipitation with an anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody. After extensive washing, the immunoprecipitated proteins were separated by electrophoresis on 12% acrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes, which were then probed with an anti-phosphotyrosine antibody (upper panel). The membrane was stripped and reprobed with an anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody (lower panel). **B)** No processing of p105 is observed in Ang II-treated VSMC. Quiescent VSMC were stimulated for different periods of time with 100 nM Ang II. Endogenous p105 and p50 proteins were detected in WCE (50  $\mu$ g) by immunoblotting using anti-p105/p50 antibody. The membrane was stripped and reprobed with an anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody (lower panel).

**Supplemental Data: Figure 3.** In vitro phosphorylation of the TAD domain of p65 by the IKK complex. Quiescent VSMC were pretreated for 30 min with 1  $\mu$ M Irbezartan (lane 5) or 0.01% vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) (lanes 1 to 4) and then stimulated with 100 nM Ang II for the indicated periods of time (lanes 1 to 5) or with 20 ng/ml TNF- $\alpha$  for 10 min (lane 7). Whole cell extracts were prepared and the immunoprecipitated IKK complex was incubated in the presence of GST-p65 (354-551). After the kinase assay, reactions were run on SDS-gels, dried and exposed to the TYPHOON image analyzer.

**Supplemental Data: Figure 4.** Ang II treatment leads to nuclear accumulation of phosphorylated p65 in the presence of MG-132. Quiescent VSMC were pre-treated with 25  $\mu$ M MG-132 for 30 min and then stimulated for the indicated periods of time with Ang II. Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared and analyzed by immunoblotting using anti-phospho-p65 (Ser536) antibody and anti-p65. The purity of the different fractions was verified by the presence of Lamin A/C and p105 in the nuclear and cytoplasmic fractions respectively.

**A**



**B**

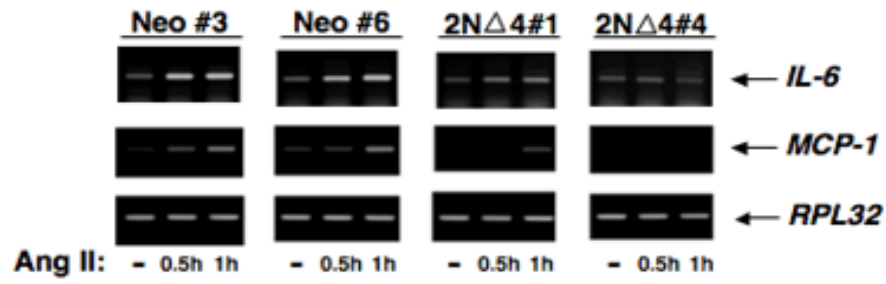
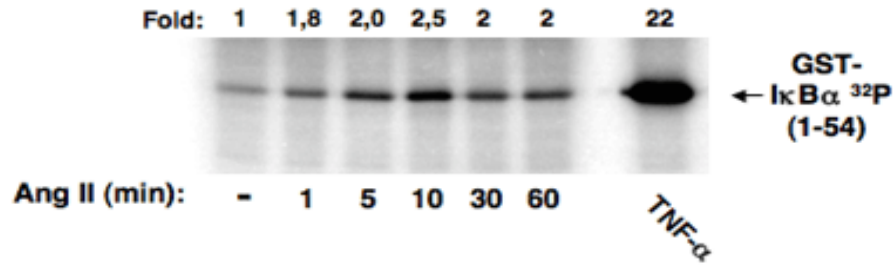
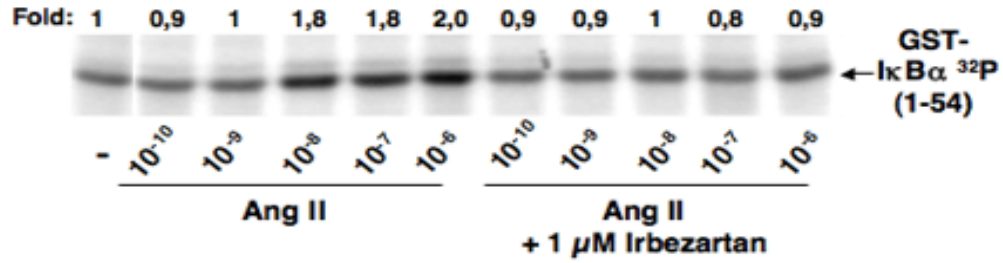


Figure 1

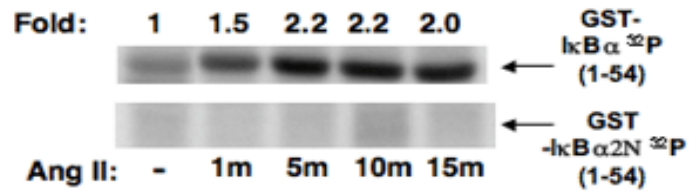
**A**



**B**



**C**



GST-IκBα wt (1-55) : 21-KKGRLDDRHD**S**GLD**S**MKDEEYEQMVKELQEIRLE-55  
 GST-IκBα 2N (1-55) : 21-KKGRLDDRHD**A**GLD**A**MKDEEYEQMVKELQEIRLE-55

Figure 2



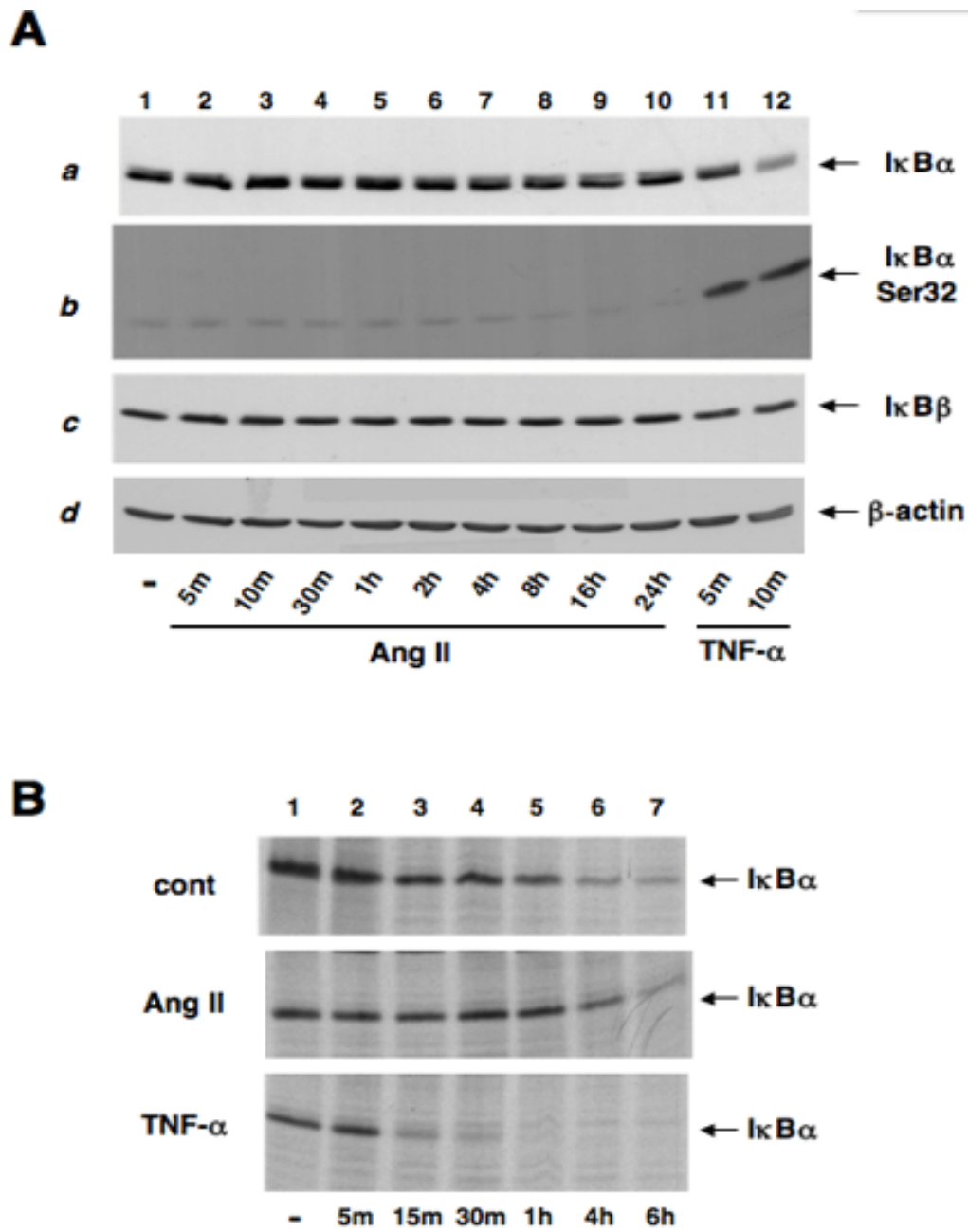
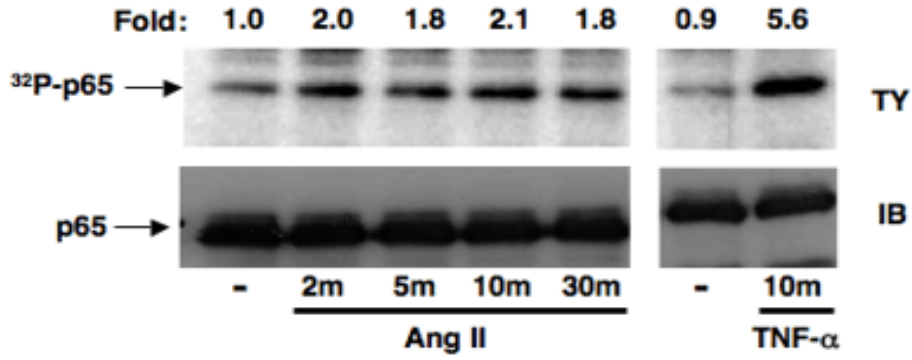


Figure 3

**A**



**B**

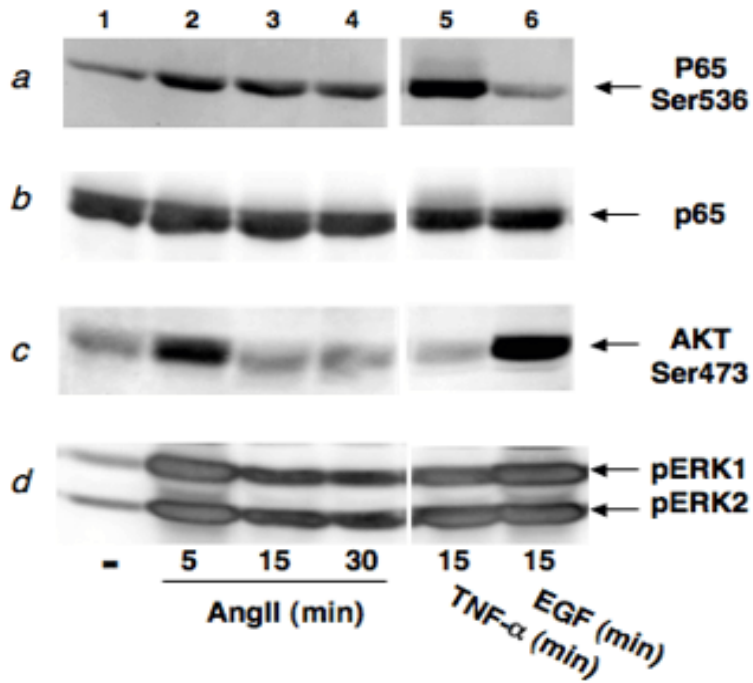
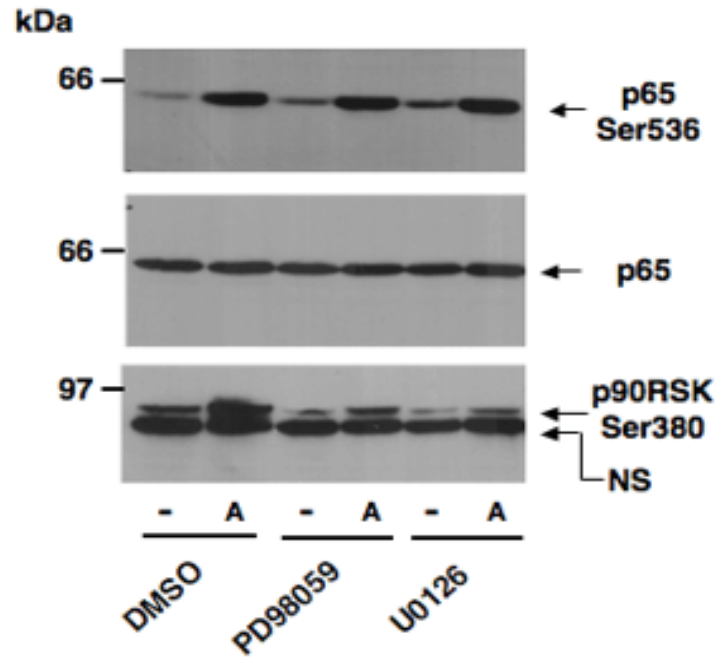


Figure 4

**A**



**B**

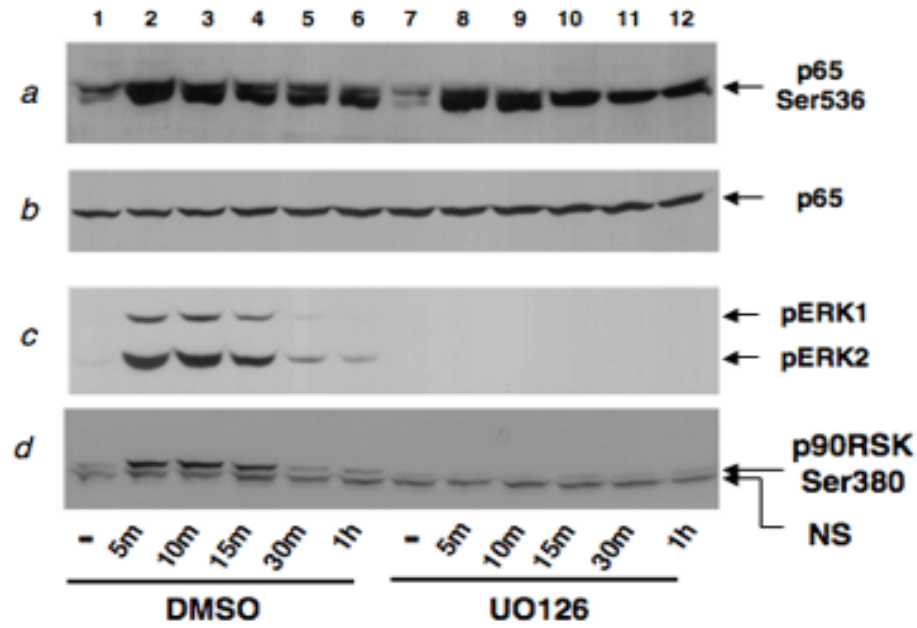
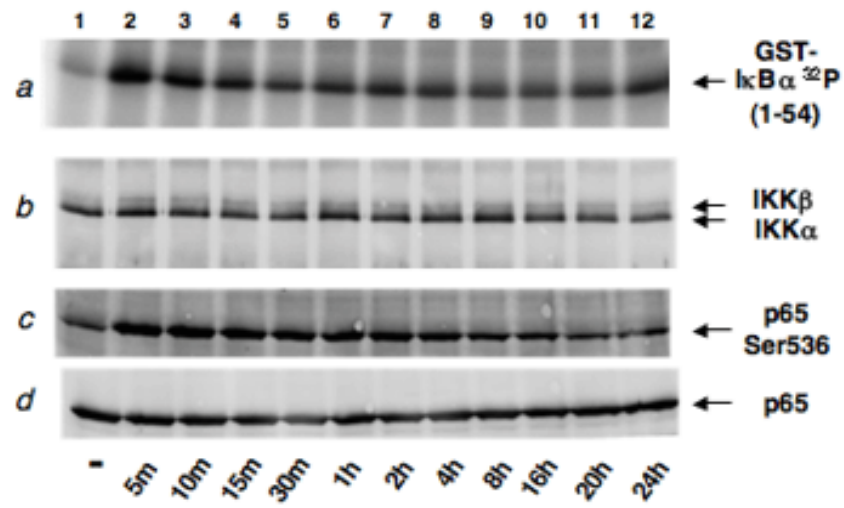
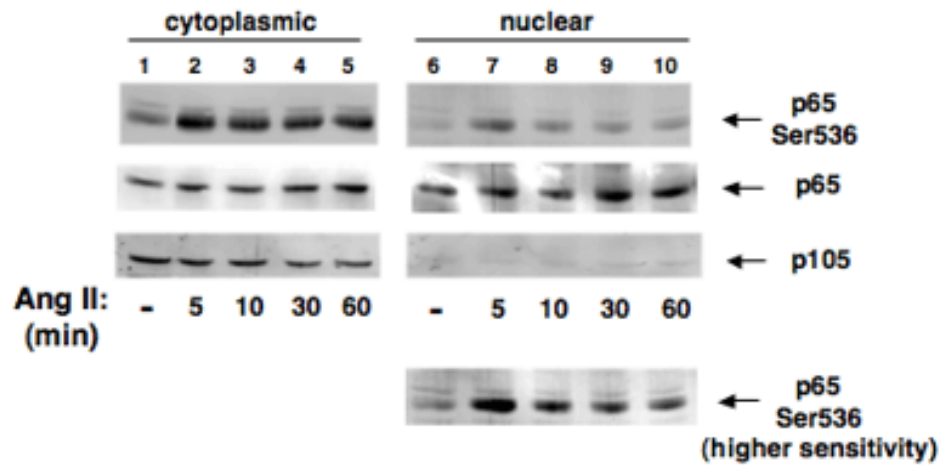


Figure 5

**C**

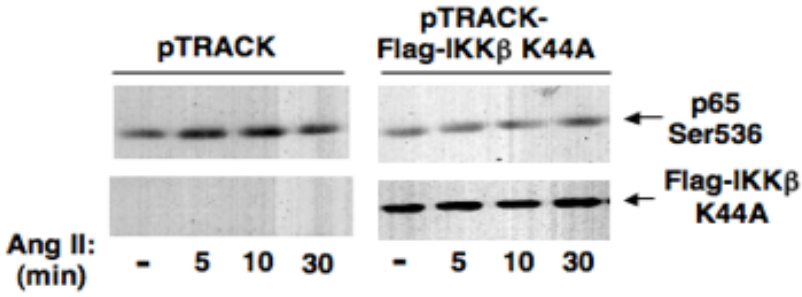


**D**



**Figure 5**

**E**



**F**

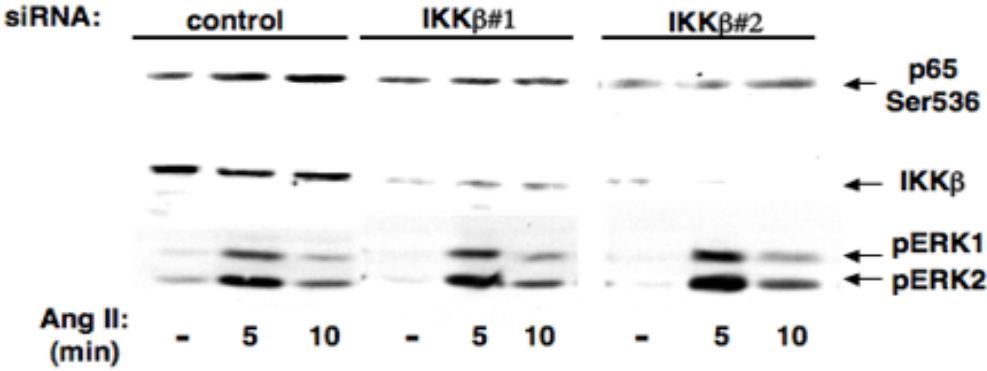


Figure 5

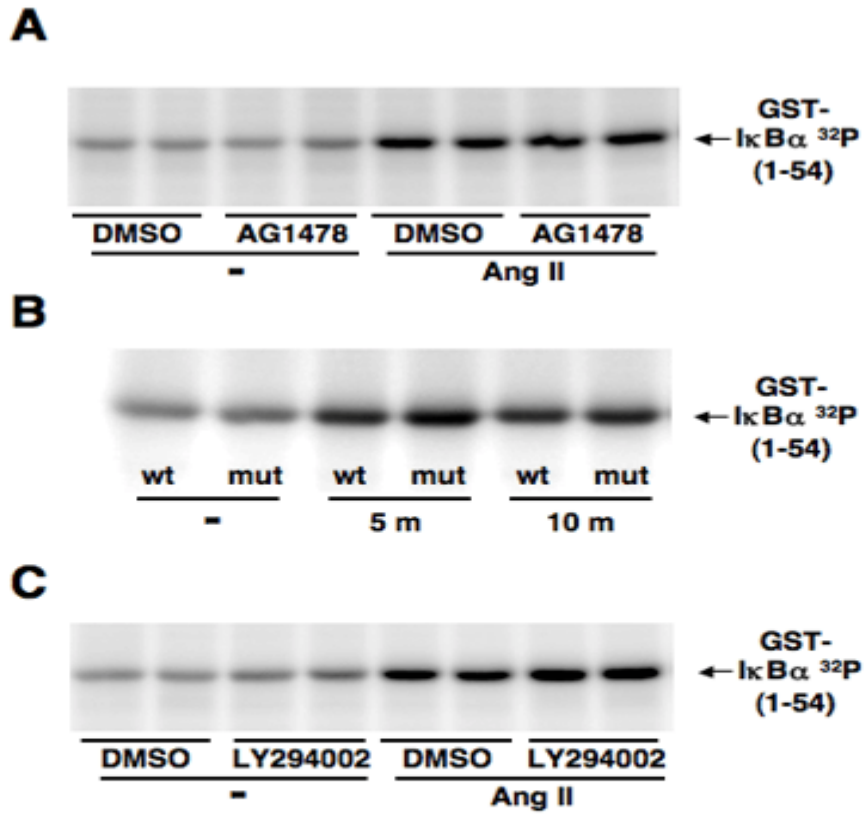
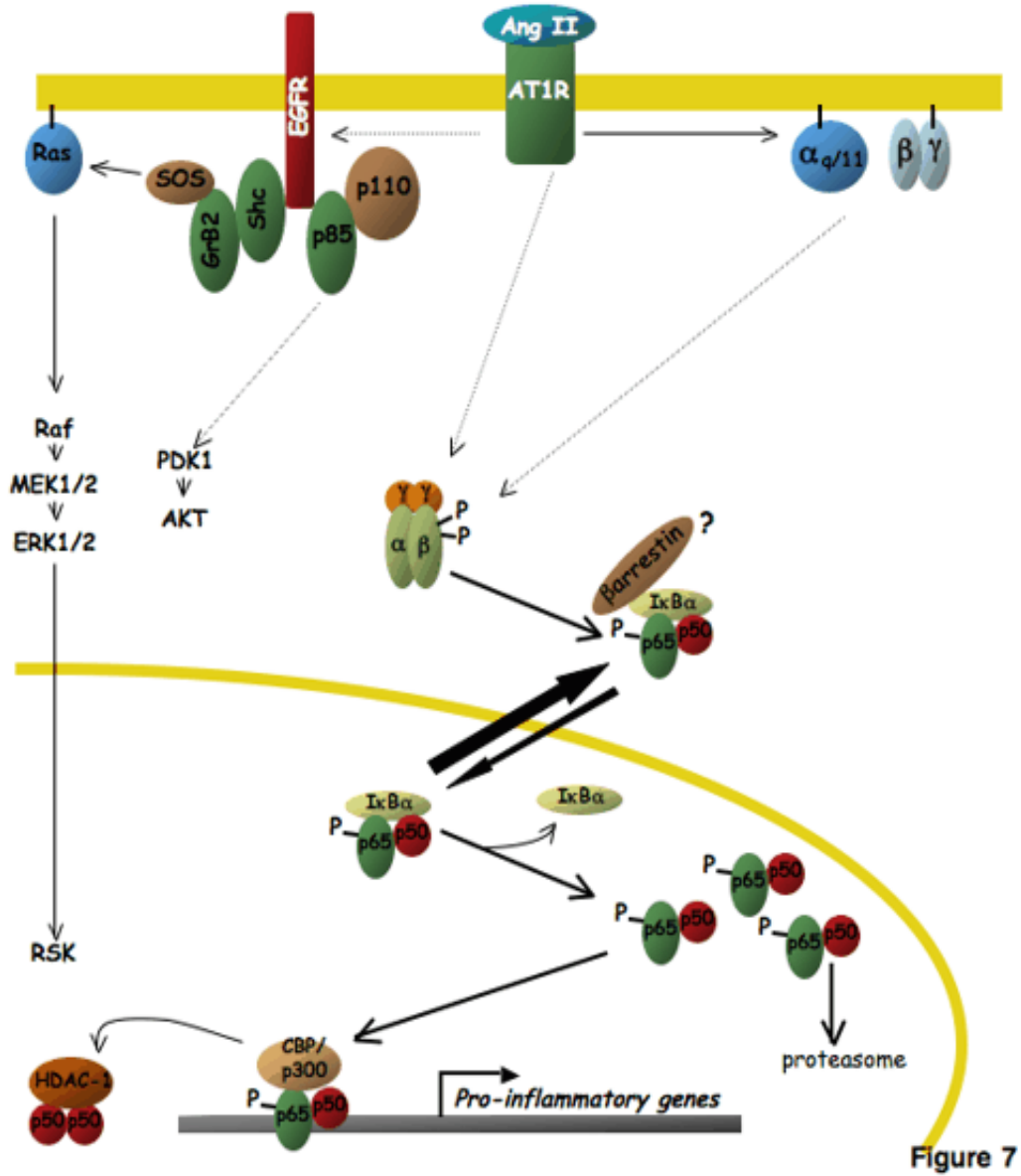
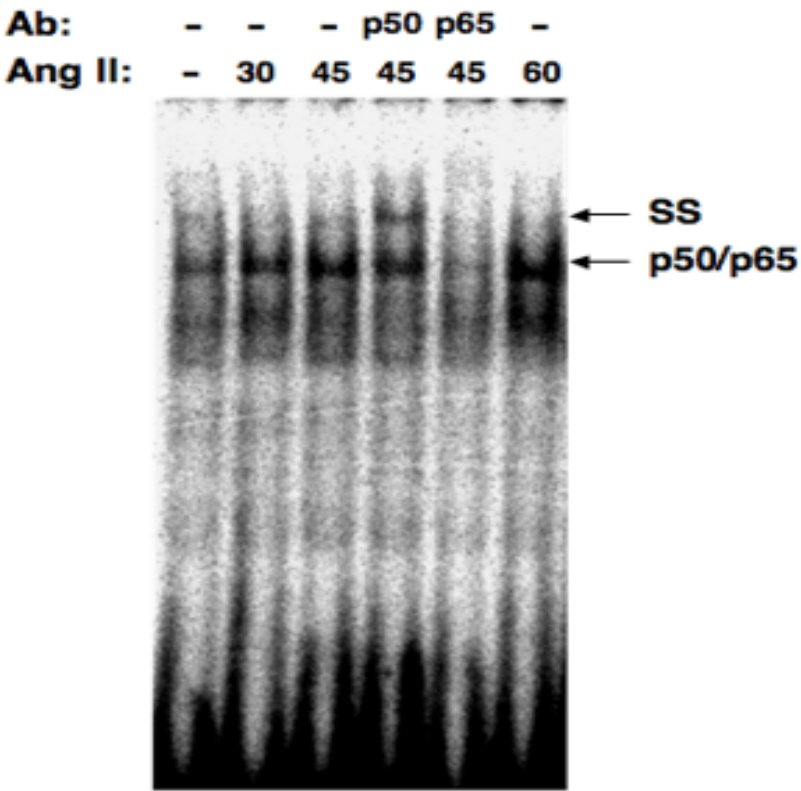


Figure 6

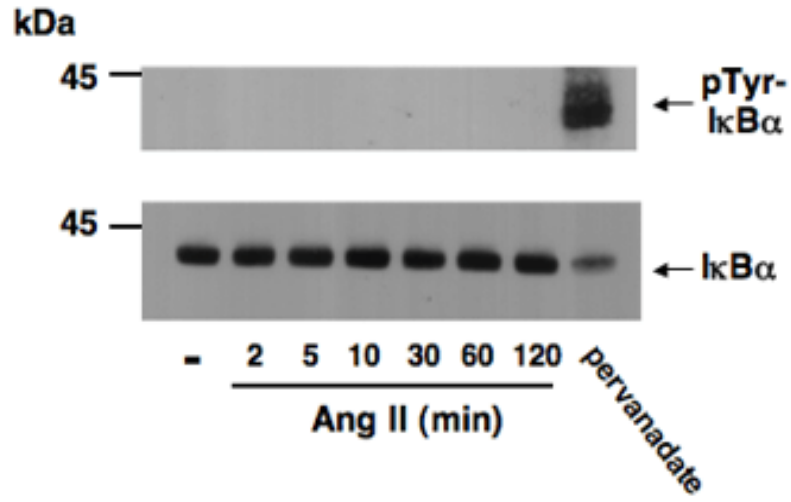




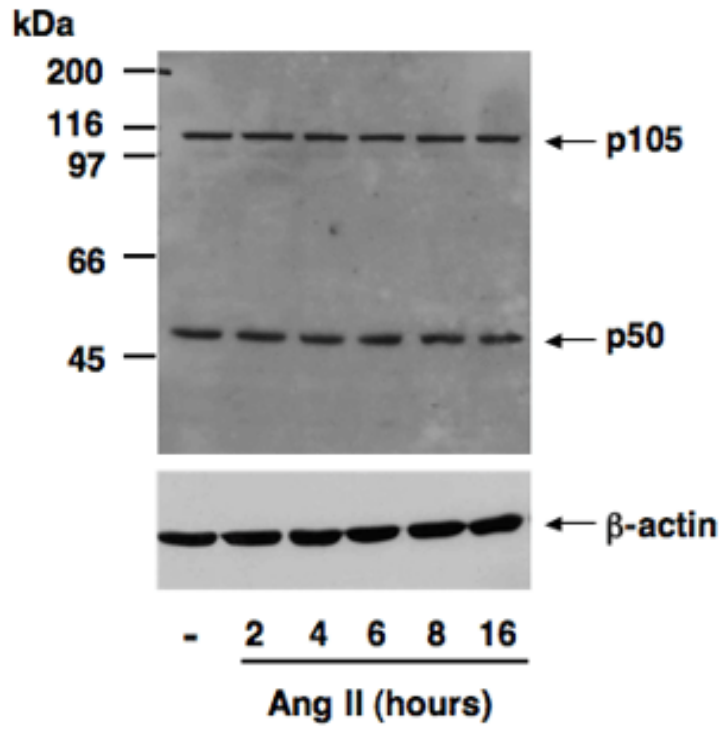
Supp. Data Figure 1



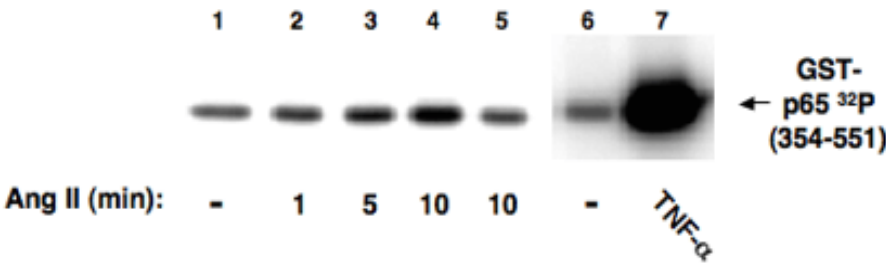
**A**



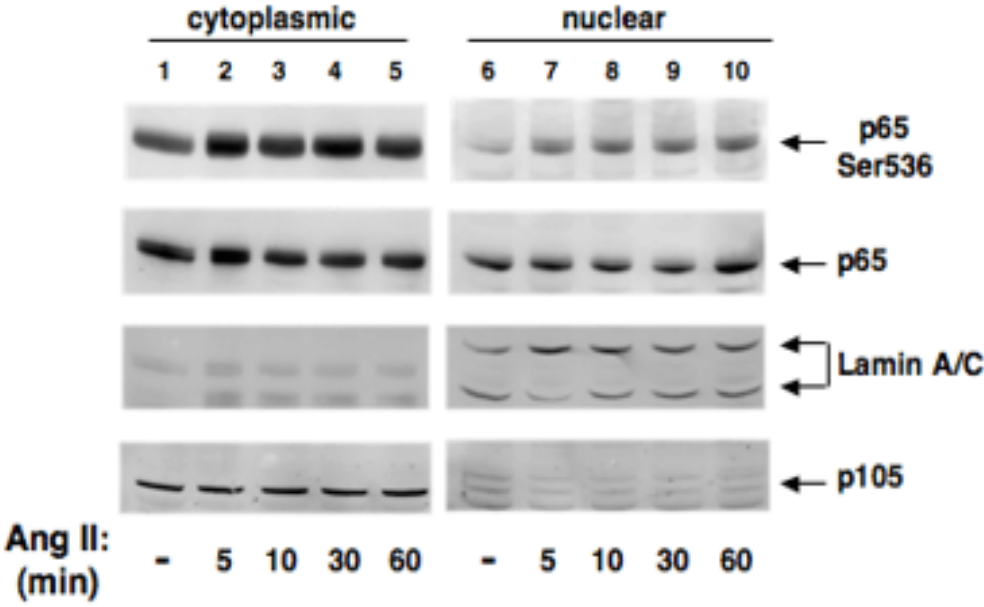
**B**



Supp. Data Figure 2



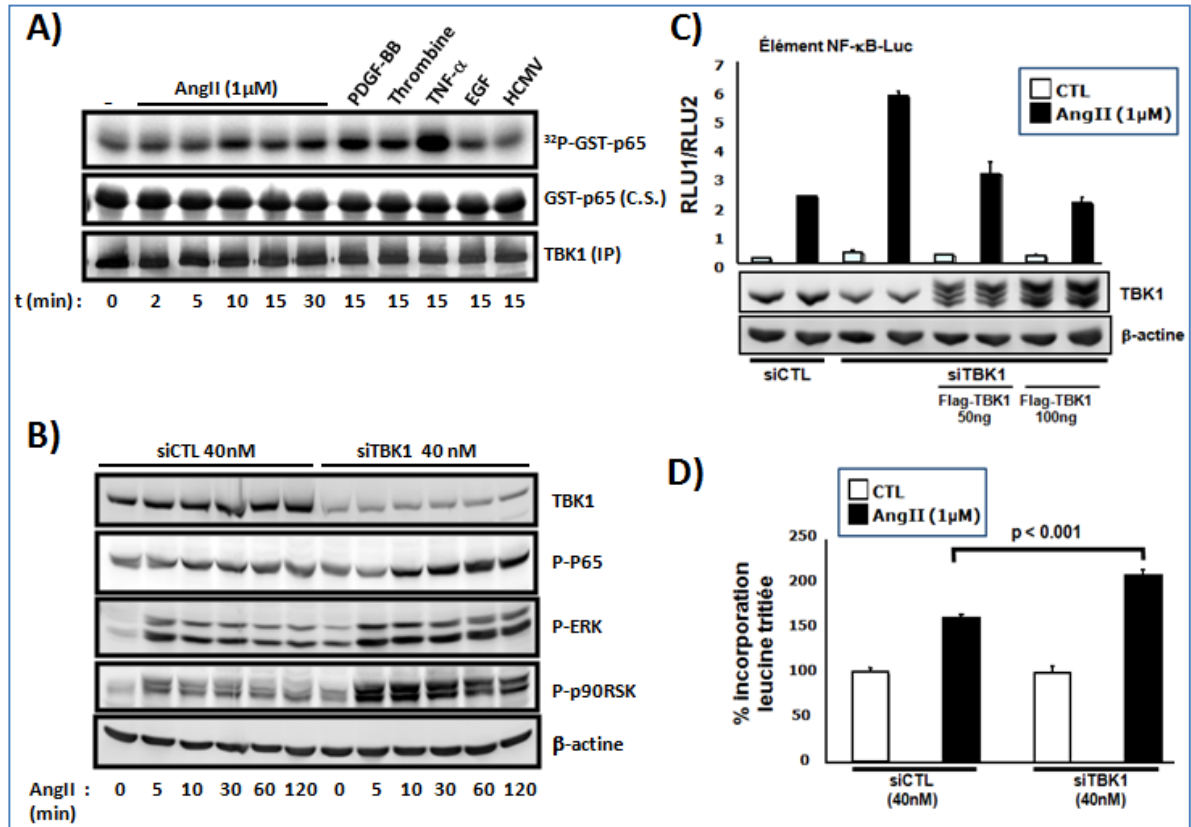
Supp. Data Figure 3



Supp. Data Figure 4

### 5.2.5 Résultats connexes

Suivant la publication de cet article, nous avons entrepris différentes expériences entre 2006 et 2008 afin de déterminer si l'AngII et d'autres agonistes de GPCR avaient la capacité d'induire l'activation de TBK1. Nous observons de manière reproductible une très faible activation de TBK1 par l'AngII dans les VSMC (figure 38A), 10 à 30 minutes après l'addition d'AngII au milieu de culture, de l'ordre de 1,2 à 1,4 fois par rapport au signal basal (ImageQuant). Il est intéressant de constater que la thrombine, un autre agoniste de GPCR, induit également l'activation de TBK1. À notre connaissance, aucune étude n'a à ce jour montré l'activation des kinases IKK-related par les GPCR. L'utilisation de l'ARN interférence contre TBK1 (et IKK-i pour éviter une compensation), dans un modèle cellulaire exprimant AT1 de manière hétérologue, nous montre que TBK1 régule négativement l'activation de p65/RelA, mais également l'activation de la voie ERK-RSK (figure 38B). Dans ce même modèle, la surexpression de TBK1, et non de TBK1-K38A, en condition de *knock down*, lève l'effet du siARN, tel qu'observé par essai rapporteur pour un promoteur NF- $\kappa$ B (figure 38C) ou un promoteur AP-1 (don de Rongtuan Lin, McGill; Gravel SP et Servant MJ, résultat non publié). L'effet de TBK1 sur la voie ERK et la transactivation d'AP-1 nous a mené à croire que nous pourrions observer un rôle physiologique de TBK1 au niveau des effets hypertrophiques de l'AngII. Bien que le modèle cellulaire utilisé ne soit pas représentatif des VSMC, nous observons une induction importante de l'incorporation de la leucine tritiée en présence d'AngII dans les HEK 293, et une incorporation significativement supérieure dans les cellules ayant subi un traitement siARN contre TBK1 (figure 38D). Ces résultats n'ayant pas trouvé d'explications lors de leur découverte, ils n'ont pu faire l'objet d'une première publication associant un GPCR à TBK1. Cependant, cet effet intrigant d'un traitement ARNi contre TBK1 sur la voie NF- $\kappa$ B et la voie MAPK est utile au raisonnement de cette thèse, et trouvera une correspondance aux sections 5.3.4, 6.3 et 6.4.



**Figure 38 : Rôle répresseur de TBK1 dans la signalisation induite par l'AngII.**

**A)** Activité phosphotransférase de TBK1 dans les VSMC de rat suivant une stimulation avec différents agonistes. Voir les articles #1 et #2 pour la méthodologie. Le HCMV a été préparé tel que décrit dans l'article #1. **B)** ARN interférence dans les QBI-HEK 293A (Qbiogene). Les cellules ont été transfectées avec une construction encodant pour HA-AT1 (Sylvain Meloche, IRIC), 2 jours après le traitement siARN. La procédure de siARN a été décrite dans l'article #1. Les anticorps utilisés sont décrits dans les articles #1 et #2. **C)** Suivant l'ARN interférence de TBK1 dans les QBI-HEK 293A (voir point B) pour une durée de 2 jours, les cellules ont été transfectées pour 24h avec PCDNA3.1-Flag-TBK1 wt et un vecteur luciférase NF-κB (voir procédure de l'essai dans [1386]) **D)** Les cellules QBI-HEK 293A ont été traitées à l'ARN interférence contre TBK1 pour 2 jours, puis la synthèse protéique a été évaluée sur une période de 24h en présence de leucine tritiée (0,5 μCi/mL, MP Biomedicals) avec ou sans ajout d'AngII. Les cellules ont été fixées à la TCA 5% et rincées en profondeur. Suivant une solubilisation dans le NaOH 0,1N, les lysats ont été dilués dans 3 parties de liquide à scintillation. Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un compteur à émissions β (Perkin-Elmer). Les triplicats biologiques ont été comparés en utilisant un test d'ANOVA suivi d'un test de Bonferroni (GraphPad Prism 5.0). C.S. : *coomassie staining*.

## **5.3 ARTICLE #3**

### **5.3.1 Travail effectué par le candidat.**

Simon-Pierre Gravel a réalisé toutes les expériences de cette publication et en est donc le premier auteur.

### **5.3.2 Accord des coauteurs**

**Lors de son deuxième dépôt, le candidat a placé ici une feuille faisant office d'autorisation des coauteurs.**

### **5.3.3 Manuscrit**

## **TANK-Binding Kinase-1 is an essential modulator of HIF-1alpha translational induction during hypoxic stress**

**Simon-Pierre Gravel<sup>1</sup>, Darren E. Richard<sup>2</sup> and Marc J. Servant<sup>1\*</sup>**

Faculté de Pharmacie<sup>1</sup>, Université de Montréal, Centre de recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec<sup>2</sup>, Department of Medicine, Université Laval,



## Abstract

Cells respond to stresses such as hypoxia, infections, and pro-inflammatory cytokines by mounting the hypoxic response, a defensive process that promotes survival in hostile conditions. Hypoxia inducible factor (HIF)-1 is a dimeric transcription factor composed of the inducible subunit HIF-1 $\alpha$ , and the ubiquitously expressed subunit HIF-1 $\beta$ /ARNT. HIF-1 is involved in the synthesis of genes that regulate angiogenesis, glucose metabolism and autophagy. HIF-1 is also implicated in inflammation and cancer. The I $\kappa$ B kinase (IKK)-related kinases, TANK-binding kinase (TBK)-1 and IKKi/ $\epsilon$ , are master regulators of type I interferon induction during infection, and their expression is linked to cancer progression. Since TBK-1 has been shown to regulate the expression of pro-angiogenic genes, we assessed its role in HIF-1 $\alpha$  expression during hypoxic stress. With the use of *Tbk1* and *Ikbke* double knockout mouse embryonic fibroblasts and lentiviral-mediated reconstitution of the wild type phenotype, we show that TBK1 is specifically required for the translational induction of HIF-1 $\alpha$  and the regulation of *Vegfa*, *Slc2a1* and *Egln1* transcripts following treatment with the hypoxia mimetic agents, cobalt chloride and desferrioxamine. Importantly, TBK1 expression is induced by both hypoxia mimetic agents and by hypoxia. TBK1 overexpression in HEK 293T cells increases HIF-1 $\alpha$  translation and promotes ERK, RSK, Akt and TSC1 phosphorylation. The use of the MEK inhibitors U0126 and PD98059 and of the RSK inhibitor BI-D1870 impairs HIF-1 $\alpha$  induction by cobalt, while cobalt-induced ERK and RSK phosphorylations in MEFs are impaired in the absence of TBK1. The data provided here thus reveal a new role of TBK1 in the control of HIF-1 $\alpha$  translation, a process which implicates the induction of the ERK-RSK pathway.

**Key Words (8) :** HIF-1, TBK1, hypoxia, ERK, RSK, TSC1, Akt, Translation

## Introduction

Hypoxia, the cellular depletion of molecular oxygen, triggers the activation of specific stress signaling pathways known as the hypoxic response. The hypoxic response plays a key protective role by stimulating erythropoiesis and angiogenesis by transcriptional induction of erythropoietin (EPO) and VEGF, respectively (extensively reviewed in [1-4]). However, there is now cumulating evidence of a relationship between the hypoxic response and disease progression. The hypoxic response has been shown to be beneficial for tumor progression and metastasis by promoting angiogenesis, glucose metabolism and autophagy [5-7]. The hypoxic response also leads to the production of cytokines and metalloproteinases and facilitates the recruitment of leucocytes [1, 8-10]. In atherosclerosis, it is thought that local hypoxia and subsequent angiogenesis are determinant factors of plaque development and may explain the transition between stable and unstable plaque [1, 11, 12]. Interestingly, it has been found that the hypoxic and innate immune responses synergize in the killing of bacteria by phagocytes [13, 14]. Thus, the hypoxic, inflammatory and innate immune responses are apparently intertwined [15].

The master regulator of the hypoxic response is hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), a heterodimeric transcription factor composed of an inducible O<sub>2</sub>-regulated subunit, HIF-1 $\alpha$ , and a constitutive subunit HIF-1 $\beta$ /ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator). HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$  are members of the basic-helix-loop-helix PAS family of transcription factors [16]. HIF-1 $\alpha$  control is complex and multi-faceted [17]. In normal growth conditions, HIF-1 $\alpha$  is hydroxylated by O<sub>2</sub>-dependent prolyl hydroxylases (PHDs), a process that leads to recruitment of the E3-ligase Von Hippel Lindau (VHL) and subsequent ubiquitination and degradation of HIF-1 $\alpha$  [18-21]. Hypoxia leads to PHDs inhibition which results in a subsequent increase in HIF-1 $\alpha$  expression. Induced HIF-1 $\alpha$  is found in the nucleus of cells subjected to hypoxia, in association with HIF-1 $\beta$  and co-

activators CBP/p300 [22]. It is well documented that the HIF-1 heterodimer binds specific hypoxia response elements (HRE) in the promoters of genes implicated in cell survival, angiogenesis and glucose metabolism [23-25].

It has recently been demonstrated that HIF-1 $\alpha$  is degraded in the nucleus by a process requiring SUMOylation and VHL-mediated degradation [26]. Although regulation of HIF-1 $\alpha$  by means of its degradation may suffice to explain its induction and turn-over, recent studies indicate that additional regulatory mechanisms exist and control the magnitude of the hypoxic response. It is now well recognized that the transcription factor NF- $\kappa$ B is involved in *Hif1a* transcription [27-31]. Importantly, the use of knockout mouse embryonic fibroblasts (MEFs) revealed that both I $\kappa$ B kinases (IKK), IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , are required for an optimal induction of HIF-1 $\alpha$  upon hypoxia [30]. Moreover, the hypoxic response in living *Ikkkb*<sup>-/-</sup> mice is dramatically reduced [31]. STAT3 [32], NFAT [33] and Egr1 [34, 35] have also been shown to be recruited to the *HIF1A* promoter. In addition, translation of HIF-1 $\alpha$  is regulated by RNA binding proteins (RBPs) (reviewed in [36, 37]). Hu antigen R (HuR) and polypyrimidine tract binding protein (PTB) bind to the 5' and 3' untranslated terminal region (UTR) of the *Hif1a* transcript, thereby increasing its stability and/or its translation during hypoxia or in the presence of the hypoxia mimetic agent cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) [38-40]. A putative IRES on the 5'-UTR was shown to be ineffective in modulating HIF-1 $\alpha$  translation [38, 41, 42]. Other RBPs such as PABP1/2 also may modulate *Hif1a* [43]. Finally, several growth factors and cytokines modulate HIF-1 $\alpha$  translation by a CAP-dependent mechanism, involving the Akt/mTOR and/or MAPK (Ras-Mek-ERK) pathways (reviewed in [17]). Importantly, HIF-1 exerts negative feedback on its own expression by inducing PHDs [44] and *REDD1*, a negative regulator of mTOR activation [45, 46].

It is noteworthy that HIF-1 $\alpha$  is induced by numerous non-hypoxic stimuli. Growth factors, cytokines and viral and bacterial pathogens are all shown inducers of HIF-1 $\alpha$ , sometimes even stronger than hypoxia itself [47-49]. This led us to investigate the implication of innate immune signalling pathways in the modulation of HIF-1 $\alpha$ . Interestingly, it was shown that the expression level of Tank-Binding Kinase (TBK)-1 was induced by CoCl<sub>2</sub> treatments and increased in solid tumours [50]. The IKK-related kinases TBK1 and IKKi/ $\epsilon$  are well-known regulators of the innate arm of the immune response [51-53]. Recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by Toll-like receptors 3/4 [52, 54] and Nod2 [55], or nucleic acids by newly discovered cytoplasmic sensors such as RIG-I, MDA5, IFI16 [56], DAI/ZBP1 [57] and RNA polymerase III [58, 59] leads to the activation of these kinases. Upon activation, TBK1 and IKKi directly phosphorylate the interferon regulatory factors (IRF)-3/-7 which are transcriptional inducers of type I interferons (reviewed in [60]). It is now clear that TBK1 and IKKi have roles outside innate immunity. Both IKK-related kinases were shown to be upregulated in cancer and to participate in tumour development ([61-64] and reviewed in [65]). TBK1 can interact with RalB-Sec5 and is required for Ras-induced transformation [61, 62]. Importantly, TBK1 loss leads to apoptosis in cancer cell lines, and also to lethal liver degeneration and apoptosis by murine embryonic day 14.5 [66]. Thus, TBK1 seems important in both development and tumor growth. *IKBKE* was shown to be amplified and IKKi expression enhanced in numerous cancers [63, 64, 67]. Although the mechanisms by which IKK-related kinases exert their oncogenic effects are poorly characterized, there is cumulating evidence that these kinases regulate the activation of the NF- $\kappa$ B pathway during oncogenic transformation. TBK1 has been shown to induce p105 processing, I $\kappa$ B $\alpha$  degradation and c-REL activation in KRAS-transformed tumors [61]. TBK1 and IKKi are both able to directly phosphorylate p65/RelA [68] and c-REL [69]. Although TBK1 was initially characterized as an IKK $\beta$  kinase [70], it was later shown that TAK1 and MEKK3 were the kinases involved in IKK $\beta$  activation [71, 72]. In fact, the use of specific pharmacological inhibitors recently indicated that the IKK-related kinases could act as repressors of IKK $\beta$ / $\alpha$

during pro-inflammatory cytokine stimulations [73]. Additionally, IKKi was shown to phosphorylate the tumor suppressor CYLD [74] and estrogen receptor  $\alpha$  [75], processes that were linked to transformation and tamoxifen resistance, respectively.

We hypothesized that IKK-related kinases could modulate HIF-1 $\alpha$  expression during hypoxia. Since HIF-1 $\alpha$  expression depends not only on its protein stability, but also on NF $\kappa$ B transcriptional induction and on RBP-mediated mRNA translation, we evaluated the mechanisms by which these oncogenic kinases could become proangiogenic. The results presented here show for the first time that TBK1, and not IKKi, is specifically required for *HIF1A* translation during hypoxic stress.

## Experimental procedures

### *Reagents, antibodies and plasmids.*

Hypoxia mimetic agents cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>) and Desferrioxamine (DFX) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO) and Calbiochem (Gibbstown, NJ), respectively. Cycloheximide (CHX), the MEK1/2 inhibitors U0126 and PD98059, the PI3K inhibitor LY294002, actinomycin D and blasticidin were from Calbiochem. BI-D1870 was a kind gift from Dr. Philippe Roux (IRIC, Montreal). The commercial antibodies were purchased from the following suppliers as follows: anti-phospho-ERK1/2 (Thr202-Tyr204) (#9101), anti-ERK1/2 (#9102), anti-phospho-p90RSK (Ser380) (#9341), anti-RSK1/2/3(#9347), anti-phospho-Akt (Ser473), anti-phospho-Akt (Thr308) antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA); anti-IKKi antibody (IMG-270A) (which also recognizes TBK1) was from Imgenex; anti- $\beta$ -actin clone AC-74 (A5316) and anti-Flag were from Sigma; anti-Myc was from Santa-Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti-T7 was from Novagen; anti-TSC1 and anti-phospho-Ser511-TSC1 were from Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, TX). Rabbit anti-HIF-1 $\alpha$  was produced by Darren Richard

and is described elsewhere [76]. Rabbit anti-IFIT1 (ISG56) was kindly donated by Ganes C. Sen (The Lerner Research Institute, Cleveland). pHIF1A-572/+284Luc reporter and pFlag-HIF-1 $\alpha$  lacking 3'-UTR were graciously provided by Dr. Gregg Semenza (Johns Hopkins University). Constructs encoding wild-type and dominant negative versions of Flag/Myc-TBK1, IKKi and IKK $\beta$ , Flag-IRF3-5D and Flag-RelA/p65 were kind gifts from Rongtuan Lin (McGill University, Montreal). pEV T7-IKK $\alpha$  wt and K44M were kind gifts from Warner Greene (University of California, San Francisco).

#### *Cell culture, transfections and treatments*

All cell lines used in the study tested negative for mycoplasma contamination. *Tbkl*<sup>+/+</sup>/*Ikbke*<sup>+/+</sup> and double knockout (DKO) MEFs were kindly provided by John Hiscott (McGill University, Montreal). HEK 293T cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) were isolated from the thoracic aortas of 6 wk-old male Wistar rats by enzymatic dissociation [77]. Cells were grown in high glucose DMEM (Wisent) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Wisent) and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. Hypoxic stress was achieved with CoCl<sub>2</sub> 200 $\mu$ M or DFX 500 $\mu$ M for the indicated times. Hypoxic conditions were obtained by placing cells in a sealed hypoxic workstation (Ruskin Technology, Bridgend, United Kingdom). The oxygen level in this workstation was maintained at 1%, with the residual gas mixture containing 94% nitrogen and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were serum-starved for 16h when indicated. DKO MEFs were immortalized according to the 3T3 immortalization protocol [78]. HEK 293T cells were transfected either with Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington, ON) or with calcium phosphate precipitates. When indicated, cells were pre-treated with inhibitors for 30 minutes prior to the addition of hypoxia-mimetic agents.

#### *Infections, selection*

Wild-type Flag-TBK1 and IKKi were subcloned in pLenti6V5 (Invitrogen). Subconfluent HEK 293T cells were transfected with empty-pLenti6V5 or pLenti6V5 encoding the

kinases, pLP1, pLP2 and pLP/VSVG (Invitrogen). Two days post-transfection, the medium containing virions was collected, clarified by 0.45µm filtration and stored at -80°C. Subconfluent DKO MEFs were infected with various dilutions of the produced virions in media containing 10µg/ml polybrene (Sigma). Selection of infected DKO MEFs was achieved with blasticidin (1-2µg/mL) for 2 weeks. Sendai virus (SeV) was from Specific Pathogen-Free Avian Supply (North Franklin, CT). SeV infections were done at 200 HAU/mL.

*Cell lysis, Immunoprecipitation, Immunoblot analysis.*

Following the different treatments, cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). Whole cell extracts were prepared as followed: cells were lysed in Triton X-100 lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 5 mM EDTA; 10% glycerol; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 50mM sodium fluoride; 40 mM 2-glycerophosphate; 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Fluka); 1 µM lepestatine A, 1µg/mL Leupeptine and 2µg/mL aprotinine (Roche) for 30 minutes on ice. Lysates were clarified by centrifugation (13000 rpm, 10 minutes). Proteins were quantified by BCA assay (Pierce), denatured in Laemmli buffer and boiled for 5 minutes at 95°C before being subjected to SDS-PAGE. Equal amounts of lysate proteins (50-75µg) were loaded on 10% polyacrylamide gels. Western blots were performed on nitrocellulose membranes (General Electric) and antibodies were used as recommended by the manufacturers. HRP-conjugated antibodies (Sigma) reacting with ECL plus (GE Healthcare) were detected with a gel documentation device (Typhoon scanner 9410; GE Healthcare).

*Reporter gene assays*

HEK 293T cells (200 000 cells/well) or DKO MEFs (60 000 cells/well) in 24-well plates were transfected by calcium phosphate coprecipitation or Lipofectamine 2000 (Invitrogen), respectively. 100 ng of firefly luciferase encoding vector and 10ng of renilla luciferase

encoding vector were transfected in HEK 293T cells. 500 ng of firefly luciferase encoding vector and 50 ng of renilla luciferase encoding vector were transfected in DKO MEFs. Cells were cotransfected with other encoding vectors as described in figure legends. Cells were harvested 24 hours post-transfection, lysed in passive lysis buffer (Promega, Madison, WI), and assayed for dual-luciferase activity with the use of 5  $\mu$ L of lysate and 25  $\mu$ L of the reagents provided by the manufacturer. Luciferase activity was measured with a luminometer (Berthold detection systems). All the values shown were obtained from the ratio of firefly to renilla luciferases fluorescence signals.

### *<sup>35</sup>S metabolic labeling experiments*

For translation studies, cysteine and methionine-starved MEFs or HEK 293T (in DMEM without cysteine and methionine (Wisent) supplemented with 10% dialysed FBS and L-glutamine) were pulse-labelled with 200-300  $\mu$ Ci/ml [<sup>35</sup>S]methionine and [<sup>35</sup>S]cysteine (Tran35S-label™, MP Biomedicals) for the indicated times. For stability experiments, cells were pulse-labelled for 2h as mentioned above and then chased for the indicated times in complete media containing an excess of L-methionine and L-cysteine (Sigma). Lysates (100-600  $\mu$ g of proteins) were incubated either with protein G-Sepharose beads preadsorbed with anti-Flag, or with protein A-Sepharose beads preadsorbed with anti-HIF-1 $\alpha$ , for 4 h at 4°C. Immune complexes were washed 4 times with Triton X-100 lysis buffer, then proteins were eluted by heating at 95°C for 5 min in Laemmli buffer and subjected to SDS-PAGE. Labeled endogenous HIF-1 $\alpha$  and overexpressed Flag-HIF-1 $\alpha$  proteins were detected by fluorography and visualized using a gel documentation device (Typhoon scanner 9410; GE Healthcare). Quantification was done with ImageQuant (GE Healthcare).



### *Quantitative PCR.*

Total RNA was extracted from cells using Trizol (Invitrogen). 2µg of total RNA was reverse transcribed in a final volume of 20 µL using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with random primers (Applied Biosystems), as described by the manufacturer. cDNA samples were stored at -20°C. Gene expression levels for endogenous controls were determined using pre-validated Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems). PCR reactions for 384-well plate formats were performed using 2 µl of cDNA (5-25 ng), 5µl of Fast Universal qPCR MasterMix (Applied Biosystems), 0.5 µl of TaqMan Gene Expression Assay (20X) and 2.5 µl of water in a total volume of 10 µl. PPIA (Cyclophilin, Mm03302254\_g1) was chosen as endogenous control for its stability during hypoxia. Some experiments were also validated with TBP (Mm00446973\_m1). SYBR Green PCR reactions were performed using 2 µl of cDNA (25-50 ng), 5 µl of Fast SYBR qPCR Master Mix (Applied Biosystems) and 10 pmol of each primer in a total volume of 10 µl. Melting curves were performed using dissociation curve software (SDS 2.2.2) to ensure only a single product was amplified. The ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed with an initial step of 3 minutes at 95°C, followed by 45 cycles of: 5 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. All reactions were run in triplicate and the average Cts values were used for quantification. The relative quantification of target genes was determined using the  $\Delta\Delta CT$  method. Briefly, the Ct (threshold cycle) values of target genes were normalized to an endogenous control gene ( $\Delta CT = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{CTRL}}$ ) and compared with a calibrator:  $\Delta\Delta CT = \Delta Ct_{\text{Sample}} - \Delta Ct_{\text{Calibrator}}$ . Relative expression (RQ) was calculated using the formula  $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ . The following mouse primers were used : *Hif1a* forward 5'-GAA ATG GCC CAG TGA GAA AA-3' and reverse 5'-CTT CCA CGT TGC TGA CTT GA -3'([79]); *Vegfa* forward 5'-GCT ACT GCC GTC CGA TTG-3' and reverse 5'-CTG CAG GGC TTC ATC GTT AC-3' ([80], *Slc2a1* forward 5'-TCT CTG TCG GCC TCT TTG TT -3' and reverse 5'-GCA GAA GGG CAA CAG GAT AC -3' and *Egln1* forward 5'-GCA ACG GAA CAG GCT ATG TC -3' and reverse 5'-CTG GCT CAT CTG CAT CAA AA -3' ([81]).

*Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.0 for Mac (GraphPad Software, San Diego California USA). Comparison of groups was carried out with one-way ANOVA and a Bonferroni post test. Statistical significance was accepted at a *P*-value below 0.05.

## Results

### *TBK1 is required for optimal induction of HIF-1 $\alpha$ -dependent transcripts during hypoxic stress*

TBK1 was recently shown to be implicated in the induction of pro-angiogenic genes [50]. We wanted to revisit that observation and determine if TBK1 was able to modulate HIF-1 $\alpha$ , since this transcription factor is the master regulator of the hypoxic response. We used *Tbk1*<sup>+/+</sup>/*Ikkbe*<sup>+/+</sup> MEFs and their double knock-out counterparts (DKO MEFs) to verify the induction of HIF-1 $\alpha$ -dependent genes during hypoxic stress. Following stimulation with CoCl<sub>2</sub>, the induction of *Vegfa* and *Slc2a1* (murine *GLUT1*) was reduced in DKO MEFs compared to wild-type (wt) MEFs (Fig. 1A and B). A similar induction profile was obtained for *Egln1* (murine proline hydroxylase 2), another HIF-1 $\alpha$ -induced gene (data not shown). To verify if both IKK-related kinases were required for these HIF-1 $\alpha$ -dependent gene expressions, we produced stable DKO MEFs that express either Flag-TBK1 or Flag-IKKi (Fig. 1C). To ascertain the functionality of the kinases, we verified that reconstituted DKO MEFs were able to induce IRF-3 activation during viral infection. As expected, cells reconstituted with either IKK-related kinase were able to induce ISG56/IFIT1 following infection with Sendai virus (Fig. 1C). Interestingly, despite its very low expression in comparison to Flag-IKKi, Flag-TBK1 allowed a strong induction of IFIT1. It is noteworthy that IKKi expression is barely detectable in wt MEFs (Fig. 2A-B, 4E, 6F and S4). Following CoCl<sub>2</sub> treatment, the inductions of *Vegfa*, *Slc2a1* and *Egln1* were all enhanced with Flag-TBK1 expression in a DKO background (Fig. 2D, E and F), while Flag-IKKi was not able to enhance the induction of the studied transcripts. These results clearly indicate that TBK1 is the major IKK-related kinase expressed in our cellular model and that it is specifically involved in the induction of HIF-1 $\alpha$  target genes.

### ***HIF-1 $\alpha$ induction by hypoxia-mimetic agents is dependent on TBK1***

Since we observed that TBK1 was involved in the induction *Vegfa*, *Slc2a1* and *Egln1* by CoCl<sub>2</sub>, we next asked if TBK1 could modulate the expression of HIF-1 $\alpha$ . In normal growth conditions, HIF-1 $\alpha$  is virtually undetectable by immunoblotting in many cell types (data not shown). Hypoxia and hypoxia-mimetic agents such as CoCl<sub>2</sub> and DFX are known to induce the expression of HIF-1 $\alpha$  [82]. Following stimulation with CoCl<sub>2</sub>, HIF-1 $\alpha$  protein expression is dramatically reduced in DKO MEFs compared to the wt MEFs (Fig. 2A). The same observation was made with the use of DFX (Fig. 2B). We next verified if the addition of Flag-TBK1 in DKO MEFs was able to reconstitute the wt phenotype. Using stable Flag-TBK1 or Flag-IKKi expressing DKO MEFs (see Fig. 1C, D, E and F), we show that CoCl<sub>2</sub>-dependent HIF-1 $\alpha$  induction was achieved in the presence of the Flag-TBK1 only (Fig. 2C). Finally, we verified if HIF-1 activity was modified in our DKO MEFs models. With the use of a HRE-promoter (HIF-1 sensitive) luciferase-encoding plasmid, we show that Flag-TBK1-expressing DKO MEFs exhibit an enhanced HIF-1 transactivating capacity following hypoxic stress (Fig. 2D). Together, these results show that TBK1 has a role in HIF-1 $\alpha$  expression during hypoxic stress.

### ***TBK1 does not modulate HIF-1 $\alpha$ stability during hypoxic stress***

During hypoxia, a major pathway that leads to HIF-1 $\alpha$  stabilization is the inhibition of PHDs which are O<sub>2</sub>-dependent enzymes. Although the HIF-1 $\alpha$  protein is known to be stabilized during hypoxia, it can still be degraded by other mechanisms such as SUMOylation [26]. To determine if TBK1 is implicated in the stability of HIF-1 $\alpha$  observed during hypoxic stress, wt and DKO MEFs were subjected to <sup>35</sup>S pulse-chase, as described in the Experimental procedures section. Our results show that HIF-1 $\alpha$  decay is not diminished by TBK1 (Fig. 3A and 3B). The same observations were obtained in reconstituted Flag-TBK1 DKO MEFs (Fig. 3C and 3D). These results clearly show that TBK1 is not involved in the stabilization of HIF-1 $\alpha$  during hypoxic stress, suggesting that TBK1 exerts its effects by other means.

***TBK1 increases HIF-1 $\alpha$  translation during hypoxic stress without modifying its basal transcription***

We next asked if TBK1 could regulate HIF-1 $\alpha$  through transcriptional and/or translational mechanisms. In pulse-chase experiments we found that [<sup>35</sup>S]-labelled HIF-1 $\alpha$  was enriched in the presence of TBK1 (Fig. 3A and 3C, see 0 min chase point). This could be explained by increased transcription and/or increased translation, both of which are known to regulate HIF-1 $\alpha$  up-regulation. We performed HIF-1 $\alpha$  pulse-labelling experiments within the CoCl<sub>2</sub> kinetic in DKO MEFs. As expected, we observed that HIF-1 $\alpha$  translation is higher throughout the stimulation time-course in cells expressing Flag-TBK1 (Fig. 4A and B). As assessed by qPCR, *Hif1a* transcript levels in basal or CoCl<sub>2</sub>-treated cells were the same in both wt and DKO MEFs (Fig. 4C). Since NF- $\kappa$ B was shown to regulate *Hif1a* transcription, we verified if the IKK-related kinases were also involved, since they both are able to modulate the NF- $\kappa$ B pathway. With the use of a firefly luciferase encoding plasmid in which the physiological human *HIF1A* promoter (-572/+284) was cloned, we show that p65/RelA, but none of the IKK-related kinases, is able to transactivate the promoter (Fig. 4D). To ascertain that transcription is not implicated in CoCl<sub>2</sub>-induced HIF-1 $\alpha$  induction, we pretreated MEFs with the transcription inhibitor actinomycin D (Act.D) prior to hypoxic stress. Clearly, our results show that transcription is not involved in the induction of HIF-1 $\alpha$  expression during hypoxic stress (Fig. 4E). This is supported by similar observations reported by other groups [83]. Additionally, pulse-labelling experiments in wt MEFs show that HIF-1 $\alpha$  is still strongly translated upon hypoxic stress with the use of Act.D pretreatment (Fig. 4F). In conclusion, our data show that TBK1 is implicated in the translation of HIF-1 $\alpha$  during hypoxia, without modulating basal or induced HIF-1 $\alpha$  transcription, which is stable within the studied time-course.

***TBK1 overexpression increases the amount of HIF-1 $\alpha$  by a translational mechanism***

It was shown that overexpression of TBK1, TRIF or IRF-3 leads to the induction of pro-angiogenic genes [50]. Since we have discovered that TBK1 was specifically involved in HIF-1 $\alpha$  translation during hypoxic stress, we wanted to verify that the same conclusions could be applied to TBK1 overexpression in a heterologous system. We employed plasmids coding for the IKK-related kinases, the canonical IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , or the transcription factors RelA/p65 and IRF3-5D (5D phosphomimetic mutant is constitutively active [84]), together with a plasmid encoding Flag-HIF-1 $\alpha$ . Strikingly, TBK1 was the only construct that had the ability to enhance the expression of the Flag-HIF-1 $\alpha$ -encoding vector (Fig. 5A). Further investigations with the use of various amounts of plasmids encoding TBK1, IKKi or their dominant negative versions confirmed that the kinase activity of TBK1 was required for HIF-1 $\alpha$  induction (Fig. 5B). We next determined if TBK1 overexpression also regulates HIF-1 $\alpha$  expression by a translational process. As it was done in MEFs (Fig. 4), we performed pulse-chase (Fig. 5C) and pulse-labelling (Fig. 5D) in HEK 293T cells to investigate Flag-HIF-1 $\alpha$  stability and translation, respectively. Our results show that the stability of HIF-1 $\alpha$  is not modified by TBK1, as expected from previous observations (Fig. 3). Densitometric analysis for Fig. 5C reveals that HIF-1 $\alpha$  decay is the same with or without TBK1 overexpression (identical slopes, data not shown). Interestingly, TBK1 strongly increased HIF-1 $\alpha$  translation, either basally or with the addition of CoCl<sub>2</sub>, while IKKi had no effect (Fig. 5D). Since these results were obtained from cells transfected with a vector encoding Flag-HIF-1 $\alpha$ , we had to rule out any transcriptional effect of TBK1 on the vector's promoter employed. We assessed TBK1's capacity to modulate the expression of various unrelated proteins from different transfected plasmids. TBK1 had no significant effect on any of the vectors tested (Fig. S1A-B), although some proteins were supershifted by means of phosphorylation or other post-translational modifications, as expected (Fig. S1A). Interestingly, TBK1 overexpression also enhanced the induction of a vector encoding Flag-HIF-1 $\alpha$  lacking its 3'-UTR (Fig.S2). Thus, our results reveal that TBK1

overexpression leads to increased HIF-1 $\alpha$  translation by a mechanism that is independent of its 5' and 3'-UTR.

***TBK1 is induced by hypoxia and is an upstream inducer of Akt, TSC1, ERK and RSK phosphorylation.***

Hypoxia is known to decrease the rate of translation by targeting the initiation step at the level of eIF4E sequestration by 4E-BP1 and eIF2 $\alpha$  phosphorylation [85-88]. eIF2 $\alpha$  is phosphorylated by PERK, while 4E-BP1 is a direct phosphorylation target of mTOR. Additionally, some transcripts are specifically induced during hypoxia by a process that involves recruitment of RBPs, although the mechanisms of action on the translation machinery are poorly characterized. Numerous reports have linked both the PI3K/Akt/mTOR and the MEK/ERK pathways to HIF-1 $\alpha$  induction [89-93]. We thus wanted first to verify if TBK1 overexpression could induce the activation of the MEK/ERK and the PI3K/Akt/mTOR pathways. TBK1 overexpression in HEK 293T cells lead to phosphorylation of endogenous ERK1/2, RSK phosphorylations (Fig. 6A) and Akt (Fig. 6B). It has been shown recently that IKK $\beta$  is able to phosphorylate TSC1, a process which leads to TSC1 degradation and activation of mTOR [94]. Since IKK-related kinases are known to share a few substrates with canonical IKKs, we wanted to verified if TBK1 overexpression could lead to TSC1 phosphorylation. Surprisingly, TBK1, but not IKK $\beta$ , induces a strong dose-dependent phosphorylation of endogenous TSC1 at Ser511 when overexpressed (Fig. S3). Moreover, increasing doses of a dominant negative version of IKK $\beta$  is unable to block TBK1 effects on TSC1 (Fig. S3, right panel). We then used specific pharmacological inhibitors to assess the induction of HIF-1 $\alpha$  expression by CoCl<sub>2</sub> in serum-starved wt MEFs. The RSK inhibitor BI-D1870 had a mild effect on HIF- $\alpha$  induction, while the IKK inhibitor MLN120B and PI3K inhibitor LY294002 had no effect (Fig. 6C-D). The use of the MEK inhibitor PD98070 increased HIF-1 $\alpha$  expression (4h30 total exposure, Fig. 6C lane 3). Interestingly, HIF-1 $\alpha$  induction by cobalt was very low in

cells pretreated with PD98070 (Fig. 6D). Although  $\text{CoCl}_2$  induced Akt phosphorylation in DMSO-treated cells (Fig. 6C lane 6), PD98070 had a synergistic effect with  $\text{CoCl}_2$  on Akt phosphorylation (lane 8). Thus, HIF-1 $\alpha$  induction seems insensitive to Akt phosphorylation status in this particular cell model. With the use of MEK inhibitor U0126, we show that HIF-1 $\alpha$  induction by  $\text{CoCl}_2$  is partially MEK-dependent (Fig. 6D). Finally, we verified the phosphorylation status of ERK, RSK, TSC1 and Akt in DKO MEFs treated with  $\text{CoCl}_2$  or DFX. As shown in Fig. 6E,  $\text{CoCl}_2$ -induced ERK1/2 and RSK phosphorylations observed in wt MEFs are severely impaired in DKO MEFs. Phosphorylation of TSC1 on Ser511 was similar in both cell types (Fig. S4A-B). Weak Akt phosphorylation is observed in  $\text{CoCl}_2$  (panel A) or DFX (panel B)-treated wt MEFs, but the signal is stronger in DKO MEFs, which does not correlate with HIF-1 $\alpha$  induction under hypoxic stress. TBK1 expression, but not IKKi, is strongly induced during the course of  $\text{CoCl}_2$  (Fig. S4A) or DFX (Fig. S4B) in cells that were serum-starved of 16h prior to stimulation. To test the effects of hypoxia on TBK1 expression in primary low passage cells, we maintained rat VSMCs in an hypoxic environment for different durations. As shown in Fig. S4C, 1% hypoxia induces TBK1 expression in VSMCs. Interestingly, the phosphorylation status of TBK1 at Ser172 was proportional to TBK1 expression. Our results thus indicate that TBK1 has the capacity to induce key translational regulatory pathways and induces HIF-1 $\alpha$  by a process which involves at least the activation the ERK-RSK pathway.



## Discussion

HIF-1 $\alpha$  induction during hypoxic stress has been shown to depend on transcription, translation and regulation of its protein stability. In this study, we found that the IKK-related kinase TBK1 was specifically required for HIF-1 $\alpha$  induction (Fig. 2C) and the induction of its known target genes (*Vegfa*, *Slc2a1* and *Egln1*) during chemical hypoxia (Fig. 2D). Interestingly, Flag-IKKi had no effect on HIF-1 $\alpha$  induction of related genes, despite a stronger expression than Flag-TBK1 in our stable reconstituted models (Fig. 2D-E and Fig. 5A-B). In fact, our data suggest that IKKi may partly inhibit the induction of HIF-1 $\alpha$  (Fig. 1D-F, Fig. 2D and Fig. 5D). In vitro data from different groups suggest that the IKK-related kinases' consensus phosphorylation motifs are distinct [74, 95] and that some substrates may be specific (reviewed in [65]). The putative role of IKKi as a negative regulator of the hypoxic response was not further investigated in the present study.

We have first assessed the stability of HIF-1 $\alpha$  during hypoxic stress. HIF-1 $\alpha$  is known to be degraded during hypoxia by a nuclear VHL-dependent mechanism involving its SUMOylation [26]. With the use of metabolic labelling experiments, we have shown that HIF-1 $\alpha$  degradation was not diminished in the presence of TBK1 (Fig. 3). We were intrigued by the increased amount of [<sup>35</sup>S]-HIF-1 $\alpha$  detected in the presence of TBK1 prior to the chase (see 0 min time points Fig. 3A and 3C). This induction was also seen in TBK1-overexpressing HEK 293T cells (Fig. 5C-D). Since our results clearly indicate that TBK1 does not stabilize HIF-1 $\alpha$  protein, we thus assessed other mechanisms that could contribute to HIF-1 $\alpha$  up-regulation by TBK1.

There is still some debate about the role of transcription during hypoxia. It is important to note that transcription inhibitors are ineffective in abrogating HIF-1 $\alpha$  induction by hypoxia mimetic agents such as CoCl<sub>2</sub> [96], DFX [97] or by hypoxia itself [97]. Also, *Hif1a* transcript levels are not always upregulated during hypoxia [31, 38]. As previously

suggested, the IKK-NF- $\kappa$ B pathway may be important for basal maintenance of HIF-1 $\alpha$  level [31]. A pool of *Hif1a* transcripts may define the amount of translated protein upon hypoxia. However, the use of actinomycin D (Fig. 4E-F) and of MLN120B (Fig. 6E, lane 10), a specific IKK $\beta$  inhibitor, did not affect HIF-1 $\alpha$  protein induction in MEFs treated with CoCl<sub>2</sub>. Although we were able to see IKK $\beta$  T-loop phosphorylation upon CoCl<sub>2</sub> treatment, this signal was not easily reproduced and may be sensitive to unknown growth conditions (data not shown). In reproducible qPCR analyses, we have demonstrated that CoCl<sub>2</sub> treatment did not induce any significant change in HIF-1 $\alpha$  transcript levels (Fig. 4E). However, we cannot exclude the importance of transcriptional processes during the course of prolonged hypoxia. The calibrator genes used for our study (*cyclophilin* and *tbp*) were not altered during CoCl<sub>2</sub> treatment (data not shown). The vast majority of our data were obtained with hypoxia-mimetic agents CoCl<sub>2</sub> and DFX. We believe that hypoxia-mimetic agents share many signalling pathways with hypoxia, and their use could lead to pertinent findings. In addition, as already suggested, cobalt poses a cellular stress itself, metal poisoning being a medical research field of interest [38].

Our data show that TBK1 is a positive regulator of HIF-1 $\alpha$  translation during hypoxic stress (Fig. 4A,B). Moreover, TBK1 overexpression was able to induce HIF-1 $\alpha$  by a transcription-independent mechanism (Fig. 5 and Fig. 4D). Our results are therefore in agreement with a recent study which found that TBK1, TRIF or IRF-3 overexpression induced the secretion of a mixture of pro-angiogenic factors, implicating TBK1 in the induction of angiogenesis [50]. However, we were unable to induce HIF-1 $\alpha$  expression with the overexpression of the constitutively active phosphomimetic version of IRF-3 (IRF-3-5D) (Fig. 5B). Moreover, TBK1 mRNA levels were induced by a heavy dose of CoCl<sub>2</sub> and upregulated in solid tumours [50]. As shown in Fig. S4, TBK1 protein expression is induced by CoCl<sub>2</sub>, DFX and hypoxia. Early TBK1 induction during the course of hypoxic stress is visible at 15 minutes. We do not provide any experimental data that could explain this rapid induction, but we suggest that TBK1 is regulated through its protein stability,

since transcription and translation are generally slower processes than post-translational modifications. Also, transcriptional inhibition with Act.D, which should inhibit TBK1 transcription, does not block HIF-1 $\alpha$  induction during hypoxic stress (Fig. 4E-F). Interestingly, it has been shown that TBK1 stability is maintained by its association with heat shock protein (Hsp)90, and that Hsp90 inhibitor geldanamycin induces TBK1 degradation by the proteasome [98].

HuR and PTBs were shown to bind *HIF1A* transcripts and to take part in its translational induction upon hypoxic stress [37]. However, TBK1 overexpression is still able to induce the expression of a mutant version of Flag-HIF-1 $\alpha$  lacking the 3'-UTR (Fig. S2). Interestingly, CPEB1/2 were shown to bind to consensus and atypical cytoplasmic polyadenylation elements (CPE) in the *Hif-1 $\alpha$*  3'-UTR [43]. It has been shown that CPEB can modulate polyadenylation, and that polyadenylation can regulate translation initiation [99, 100]. Search for CPE motifs within the *HIF1A* ORF revealed the presence of 3 consensus motifs on exons 2, 11 and 15. Thus, *HIF1A* may recruit CPEB independently of its UTRs, a hypothesis that is currently being assessed.

TBK1 overexpression in HEK 293T cells leads to increased ERK, RSK, Akt and TSC1 phosphorylations (Fig. 6 and Fig. S3). It has already been shown that the MEK-ERK and the PI3K-Akt-mTOR pathways are implicated in HIF-1 $\alpha$  induction in various conditions [89-93]. Although Akt is involved in HIF-1 $\alpha$  translational induction during normoxia and hypoxia, the process was shown to be mTOR independent [101]. We could reproducibly detect a weak Akt phosphorylation signal upon hypoxic stress or TBK1 overexpression (Fig. 6B and Fig. S4), but Akt phosphorylation status does not seem to be correlated with HIF-1 $\alpha$  induction, even with the use of PI3K inhibitor LY294002, which successfully abrogated phosphorylation on Ser 473 (Fig. 6E, lane 9). The TSC complex is known to be inhibited by means of phosphorylation. TSC2 is phosphorylated by ERK, RSK and Akt. TSC1 Ser511, as well as Ser487, were shown to be directly targeted by IKK $\beta$  [94]. Since

TBK1 shares some substrates with canonical IKKs, and since TSC1-Ser511 is located next to a leucine, which could represent a minimal TBK1/IKKi phosphorylation motif X-S-L-X, we verified if TSC1-Ser511 phosphorylation was induced by TBK1 or hypoxic stress. However, we were not able to detect any increase in TSC1 Ser511 phosphorylation upon hypoxic stress, as we have seen with TBK1 overexpression (compare Fig. S3 and S4). Importantly, TBK1-induced TSC1 phosphorylation was IKK $\beta$ -independent (Fig. S3, right panel). It is noteworthy that TBK1 overexpression induced low molecular weight phosphorylated forms of TSC1 (below the 117 kDa band), which could be the products of proteolysis (Fig. S3). Finally, the use of pharmacological inhibitors of MEK and RSK impaired HIF-1 $\alpha$  induction by CoCl<sub>2</sub> (Fig. 6C-D). Strikingly, ERK and RSK phosphorylation inductions were both reduced in DKO MEFs during hypoxic stress (Fig. 6F). Interestingly, TBK1 absence does not completely abrogate HIF-1 $\alpha$  expression or the induction of HIF-1 $\alpha$ -dependent genes. Thus, other mechanisms are implicated in HIF-1 $\alpha$  induction by hypoxic stress, such as regulation of protein stability.

In conclusion, our data reveal for the first time the implication of TBK1 in translation. IKK-related kinases play a major role in the elimination of viral pathogens. They were also recently shown to be associated with cell survival and cancer. The translational role of TBK1 in angiogenesis could be essential for development, while being detrimental in pathological conditions such as cancer and atherosclerosis. We have already suggested that TBK1 could be an important regulator of pro-inflammatory cytokine secretion in atherosclerosis [102]. Thus, the data presented here strengthen the role of TBK1 as a putative vector of inflammation.

## **Acknowledgments**

We are grateful to the Genomic team at the IRIC (University of Montreal) for their expertise in qPCR. We thank Monique Arts and Tasheen Wissanji for editing assistance.

## References

1. Holm, P.W., et al., *Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF*. Ann Med, 2009. **41**(4): p. 257-64.
2. Rey, S. and G.L. Semenza, *Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling*. Cardiovasc Res. **86**(2): p. 236-42.
3. Tsiftoglou, A.S., I.S. Vizirianakis, and J. Strouboulis, *Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs*. IUBMB Life, 2009. **61**(8): p. 800-30.
4. Fong, G.H., *Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms*. J Mol Med, 2009. **87**(6): p. 549-60.
5. Pennacchietti, S., et al., *Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene*. Cancer Cell, 2003. **3**(4): p. 347-61.
6. Chan, D.A. and A.J. Giaccia, *Hypoxia, gene expression, and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(2): p. 333-9.
7. Bellot, G., et al., *Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(10): p. 2570-81.
8. Kim, K.S., et al., *A novel role of hypoxia-inducible factor in cobalt chloride- and hypoxia-mediated expression of IL-8 chemokine in human endothelial cells*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7211-24.
9. Rydberg, E.K., et al., *Hypoxia increases 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 protein secretion in human macrophages*. Atherosclerosis, 2003. **170**(2): p. 245-52.
10. Ahn, J.K., et al., *Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced expressions of IL-8, MMP-1 and MMP-3 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(6): p. 834-9.
11. Sluimer, J.C. and M.J. Daemen, *Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis*. J Pathol, 2009. **218**(1): p. 7-29.

12. Virmani, R., et al., *Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2054-61.
13. Peyssonnaud, C., et al., *HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(7): p. 1806-15.
14. Anand, R.J., et al., *Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner*. *J Leukoc Biol*, 2007. **82**(5): p. 1257-65.
15. Nizet, V. and R.S. Johnson, *Interdependence of hypoxic and innate immune responses*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(9): p. 609-17.
16. Kewley, R.J., M.L. Whitelaw, and A. Chapman-Smith, *The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(2): p. 189-204.
17. Yee Koh, M., T.R. Spivak-Kroizman, and G. Powis, *HIF-1 regulation: not so easy come, easy go*. *Trends Biochem Sci*, 2008. **33**(11): p. 526-34.
18. Ohh, M., et al., *Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(7): p. 423-7.
19. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. *Nature*, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
20. Jaakkola, P., et al., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. *Science*, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
21. Yu, F., et al., *HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(17): p. 9630-5.
22. Ruas, J.L., et al., *Complex regulation of the transactivation function of hypoxia-inducible factor-1 alpha by direct interaction with two distinct domains of the CREB-binding protein/p300*. *J Biol Chem*. **285**(4): p. 2601-9.
23. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation*. *Mol Cell Biol*, 1992. **12**(12): p. 5447-54.
24. Hofer, T., H. Wenger, and M. Gassmann, *Oxygen sensing, HIF-1alpha stabilization and potential therapeutic strategies*. *Pflugers Arch*, 2002. **443**(4): p. 503-7.

25. Benita, Y., et al., *An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(14): p. 4587-602.
26. Cheng, J., et al., *SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1alpha during hypoxia*. Cell, 2007. **131**(3): p. 584-95.
27. Qiao, Q., et al., *NF-kappaB mediates aberrant activation of HIF-1 in malignant lymphoma*. Exp Hematol, 2010. **38**(12): p. 1199-208.
28. Bonello, S., et al., *Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 755-61.
29. Belaiba, R.S., et al., *Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(12): p. 4691-7.
30. van Uden, P., N.S. Kenneth, and S. Rocha, *Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB*. Biochem J, 2008. **412**(3): p. 477-84.
31. Rius, J., et al., *NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha*. Nature, 2008. **453**(7196): p. 807-11.
32. Niu, G., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1alpha RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(7): p. 1099-105.
33. Walczak-Drzewiecka, A., et al., *HIF-1alpha is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1665-72.
34. Sperandio, S., et al., *The transcription factor Egr1 regulates the HIF-1alpha gene during hypoxia*. Mol Carcinog, 2009. **48**(1): p. 38-44.
35. Patel, N. and V.K. Kalra, *Placenta growth factor-induced early growth response 1 (Egr-1) regulates hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in endothelial cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(27): p. 20570-9.
36. Masuda, K., K. Abdelmohsen, and M. Gorospe, *RNA-binding proteins implicated in the hypoxic response*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(9A): p. 2759-69.
37. Galban, S. and M. Gorospe, *Factors interacting with HIF-1alpha mRNA: novel therapeutic targets*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(33): p. 3853-60.



38. Galban, S., et al., *RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(1): p. 93-107.
39. Sheflin, L.G., A.P. Zou, and S.W. Spaulding, *Androgens regulate the binding of endogenous HuR to the AU-rich 3'UTRs of HIF-1alpha and EGF mRNA*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(2): p. 644-51.
40. Schepens, B., et al., *The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1alpha IRES-mediated translation during hypoxia*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(21): p. 6884-94.
41. Bert, A.G., et al., *Assessing IRES activity in the HIF-1alpha and other cellular 5' UTRs*. RNA, 2006. **12**(6): p. 1074-83.
42. Young, R.M., et al., *Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosome entry site-independent mechanism*. J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16309-19.
43. Hagele, S., et al., *Cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein (CPEB)1 and 2 bind to the HIF-1alpha mRNA 3'-UTR and modulate HIF-1alpha protein expression*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 235-46.
44. Aprelikova, O., et al., *Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors*. J Cell Biochem, 2004. **92**(3): p. 491-501.
45. Shoshani, T., et al., *Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(7): p. 2283-93.
46. Horak, P., et al., *Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(10): p. 4675-80.
47. Hellwig-Burgel, T., et al., *Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(6): p. 297-310.
48. Richard, D.E., E. Berra, and J. Pouyssegur, *Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 26765-71.
49. Zinkernagel, A.S., R.S. Johnson, and V. Nizet, *Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection*. J Mol Med, 2007. **85**(12): p. 1339-46.

50. Korherr, C., et al., *Identification of proangiogenic genes and pathways by high-throughput functional genomics: TBK1 and the IRF3 pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4240-5.
51. Sharma, S., et al., *Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1148-51.
52. Fitzgerald, K.A., et al., *IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 491-6.
53. Chau, T.L., et al., *Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK-epsilon similarly activated?* Trends Biochem Sci, 2008. **33**(4): p. 171-80.
54. Fitzgerald, K.A., et al., *LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF*. J Exp Med, 2003. **198**(7): p. 1043-55.
55. Sabbah, A., et al., *Activation of innate immune antiviral responses by Nod2*. Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1073-80.
56. Unterholzner, L., et al., *IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA*. Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 997-1004.
57. Takaoka, A., et al., *DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 501-5.
58. Chiu, Y.H., J.B. Macmillan, and Z.J. Chen, *RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway*. Cell, 2009. **138**(3): p. 576-91.
59. Ablasser, A., et al., *RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate*. Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1065-72.
60. Hiscott, J., *Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation*. J Biol Chem, 2007. **282**(21): p. 15325-9.
61. Barbie, D.A., et al., *Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1*. Nature, 2009. **462**(7269): p. 108-12.
62. Chien, Y., et al., *RalB GTPase-mediated activation of the IkappaB family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival*. Cell, 2006. **127**(1): p. 157-70.

63. Guo, J.P., et al., *Deregulation of IKBKE is associated with tumor progression, poor prognosis, and cisplatin resistance in ovarian cancer*. Am J Pathol, 2009. **175**(1): p. 324-33.
64. Boehm, J.S., et al., *Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1065-79.
65. Clement, J.F., S. Meloche, and M.J. Servant, *The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis*. Cell Res, 2008. **18**(9): p. 889-99.
66. Bonnard, M., et al., *Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription*. EMBO J, 2000. **19**(18): p. 4976-85.
67. Guan, H., et al., *IKBKE is over-expressed in glioma and contributes to resistance of glioma cells to apoptosis via activating NF-kappaB*. J Pathol, 2011. **223**(3): p. 436-45.
68. Buss, H., et al., *Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- $\kappa$ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I $\kappa$ B kinase (IKK)- $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\epsilon$ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55633-43.
69. Harris, J., et al., *Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK epsilon*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2527-35.
70. Tojima, Y., et al., *NAK is an IkappaB kinase-activating kinase*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 778-82.
71. Wang, C., et al., *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 346-51.
72. Yang, J., et al., *The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 620-4.
73. Clark, K., et al., *Novel cross-talk within the IKK family controls innate immunity*. Biochem J, 2010.
74. Hutti, J.E., et al., *Phosphorylation of the tumor suppressor CYLD by the breast cancer oncogene IKKepsilon promotes cell transformation*. Mol Cell, 2009. **34**(4): p. 461-72.

75. Guo, J.P., et al., *IKKepsilon phosphorylation of estrogen receptor alpha Ser-167 and contribution to tamoxifen resistance in breast cancer*. J Biol Chem, 2010. **285**(6): p. 3676-84.
76. Richard, D.E., et al., *p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32631-7.
77. Owens, G.K., et al., *Expression of smooth muscle-specific alpha-actin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation*. J Cell Biol, 1986. **102**(2): p. 343-52.
78. Todaro, G.J. and H. Green, *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines*. J Cell Biol, 1963. **17**: p. 299-313.
79. Dehne, N., et al., *The HIF-1 response to simulated ischemia in mouse skeletal muscle cells neither enhances glycolysis nor prevents myotube cell death*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(4): p. R1693-701.
80. Milosevic, J., et al., *Lack of hypoxia-inducible factor-1 alpha impairs midbrain neural precursor cells involving vascular endothelial growth factor signaling*. J Neurosci, 2007. **27**(2): p. 412-21.
81. Stiehl, D.P., et al., *Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system*. J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23482-91.
82. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction*. Blood, 1993. **82**(12): p. 3610-5.
83. Page, E.L., et al., *Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48403-9.
84. Lin, R., et al., *Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2986-96.
85. Koritzinsky, M., et al., *Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control*. EMBO J, 2006. **25**(5): p. 1114-25.

86. Connolly, E., et al., *Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4E-BP1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by mTOR and uncoupled in breast cancer cells*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(10): p. 3955-65.
87. Koumenis, C., et al., *Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(21): p. 7405-16.
88. Liu, L., et al., *Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 521-31.
89. Fujita, D., et al., *Role of extracellular signal-regulated kinase and AKT cascades in regulating hypoxia-induced angiogenic factors produced by a trophoblast-derived cell line*. J Endocrinol, 2010. **206**(1): p. 131-40.
90. Choi, Y.K., et al., *Carbon monoxide promotes VEGF expression by increasing HIF-1alpha protein level via two distinct mechanisms, translational activation and stabilization of HIF-1alpha protein*. J Biol Chem, 2010. **285**(42): p. 32116-25.
91. Alam, H., et al., *Role of the phosphatidylinositol-3-kinase and extracellular regulated kinase pathways in the induction of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and the HIF-1 target vascular endothelial growth factor in ovarian granulosa cells in response to follicle-stimulating hormone*. Endocrinology, 2009. **150**(2): p. 915-28.
92. Doronzo, G., et al., *Insulin activates hypoxia-inducible factor-1alpha in human and rat vascular smooth muscle cells via phosphatidylinositol-3 kinase and mitogen-activated protein kinase pathways: impairment in insulin resistance owing to defects in insulin signalling*. Diabetologia, 2006. **49**(5): p. 1049-63.
93. Trisciuoglio, D., et al., *Involvement of PI3K and MAPK signaling in bcl-2-induced vascular endothelial growth factor expression in melanoma cells*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 4153-62.
94. Lee, D.F., et al., *IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway*. Cell, 2007. **130**(3): p. 440-55.
95. Soulat, D., et al., *The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response*. EMBO J, 2008. **27**(15): p. 2135-46.
96. Chachami, G., et al., *Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(5): p. 544-51.

97. Demidenko, Z.N., et al., *Accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha is limited by transcription-dependent depletion*. *Oncogene*, 2005. **24**(30): p. 4829-38.
98. Yang, K., et al., *Hsp90 regulates activation of interferon regulatory factor 3 and TBK-1 stabilization in Sendai virus-infected cells*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(3): p. 1461-71.
99. Richter, J.D., *CPEB: a life in translation*. *Trends Biochem Sci*, 2007. **32**(6): p. 279-85.
100. Burgess, H.M. and N.K. Gray, *mRNA-specific regulation of translation by poly(A)-binding proteins*. *Biochem Soc Trans*, 2010. **38**(6): p. 1517-22.
101. Pore, N., et al., *Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1alpha expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway*. *Mol Cancer Res*, 2006. **4**(7): p. 471-9.
102. Gravel, S.P. and M.J. Servant, *Roles of an IkappaB kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(9): p. 7477-86.

## Abbreviations :

Act. D (Actinomycin D); cobalt chloride ( $\text{CoCl}_2$ ); coomassie staining (c.s.), desferroxamine (DFX); *Tbk1* and *Ikbke* double knock-out (DKO); dominant negative (dn); dimethylsulfoxide (DMSO); extracellular signal-regulated kinase (ERK), fetal bovine serum (FBS); glucose transporter 1 (glut-1); hemagglutinin units (HAU); hypoxa inducible factor (HIF), ikappaB-kinase (IKK), interferon-induced with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1), immunoprecipitation (IP); mouse embryonic fibroblasts (MEFs); quantitative polymerase chain reaction (qPCR); ribosomal S6 kinase (RSK); reverse transcription (RT); sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE); Sendaï virus (SeV), tank-binding kinase 1 (TBK1); tuberous sclerosis complex (TSC); vascular endothelial growth factor (vegf); wild-type (wt).

This work was supported by a research grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

## Figure Legends

**Figure 1.** TBK1 is specifically required for the induction of HIF-1-regulated genes during hypoxic stress. **(A-B)** *Tbk1*<sup>+/+</sup>/*Ikbke*<sup>+/+</sup> and DKO MEFs were treated with CoCl<sub>2</sub> (200 μM) for the indicated times, then total RNA was extracted and subjected to RT-qPCR. *Cyclophilin* was chosen as a calibrator. **(C)** DKO MEFs were infected with recombinant lentivirus virions encoding wt TBK1/IKKi Flag-kinases or no transgene. Reconstituted cells were selected with blasticidin at 2 μg/ml for 2 weeks. Blasticidin-resistant cells were infected with SeV (200HAU/mL) for 24h. Cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis with the indicated antibodies. **(D-F)** Total RNA from reconstituted DKO MEFs (as prepared in C) was subjected to qPCR as described in A-B. Data from qPCR (A-B, D-F) are means +/- SEM (n=3). \* significant difference between the two groups joined by a line, where \* represents p<0.01 and \*\*\* p<0.001. Results shown are representative of at least 3 independent experiments.

**Figure 2.** Full HIF-1α protein induction by hypoxic stress is dependent on TBK1 expression and not IKKi. *Tbk1*<sup>+/+</sup>/*Ikbke*<sup>+/+</sup> and DKO MEFs were treated with CoCl<sub>2</sub> (200 μM) **(A)** or DFX (500 μM) **(B)** for the indicated times, then cell extracts were prepared and subjected to immunoblotting analysis with the indicated antibodies. **(C)** Stable Flag-TBK1 or Flag-IKKi-expressing DKO MEFs (see Fig. 1C) were treated as in A-B with CoCl<sub>2</sub>. **(D)** Stable DKO MEFs expressing or not Flag-IKK-related kinases were transfected with HRE-PGL3 and pRL-TK for 24h prior to a 6h treatment with CoCl<sub>2</sub>. Cell extracts were assessed for luciferase activity with a luminometer. Results shown are representative of at least 3 experiments.

**Figure 3.** TBK1 has no role in hypoxic stress-induced HIF-1α protein stabilization. *Tbk1*<sup>+/+</sup>/*Ikbke*<sup>+/+</sup> and DKO MEFs **(A)** or DKO MEFs reconstituted with functional Flag-TBK1 **(C)** (see Fig. 1C) were maintained for 1h in cysteine and methionine-free DMEM



growth media supplemented with L-glutamine and dialysed FBS. Cells were treated with  $\text{CoCl}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ) for 2h in the presence of 0.3mM  $^{35}\text{S}$ -methionine, then washed with complete media containing  $\text{CoCl}_2$  plus an excess of methionine and cysteine for the indicated times. HIF-1 $\alpha$  was immunoprecipitated from total cellular extracts. After extensive washes, the immunoprecipitated proteins were separated by SDS-gel electrophoresis and analyzed by fluorography using a gel documentation device (Typhoon 9410). **(B)** and **(D)** Densitometric analysis of the data shown in A and C, respectively. The  $^{35}\text{S}$ -HIF-1 $\alpha$  densitometric value was set at 100 for the  $t = 0$  min chase point, and other values were adjusted accordingly. These experiments were done independently 3 times.

**Figure 4.** TBK1 enhances HIF-1 $\alpha$  translation without modulating its transcriptional induction. **(A)** Stable DKO MEFs expressing no transgene or functional Flag-TBK1 (see Fig. 1C) were maintained for 1h in cysteine and methionine-free DMEM growth media supplemented with L-glutamine and dialysed FBS, then treated with  $\text{CoCl}_2$  200 $\mu\text{M}$  for the indicated times. Cells were pulsed with  $^{35}\text{S}$ -Met and  $^{35}\text{S}$ -Cys (0.3mCi/mL) for 30 minutes during the course of  $\text{CoCl}_2$  treatment (indicated as pulse windows). HIF-1 $\alpha$  was immunoprecipitated from whole cellular extracts and analysed for  $^{35}\text{S}$ -incorporation. **(B)** Densitometric analysis of  $^{35}\text{S}$ -HIF-1 $\alpha$  intensity values from two independent experiments. **(C)** *Tbk1*<sup>+/+</sup>/*Ikbke*<sup>+/+</sup> MEFs and DKO MEFs were treated with  $\text{CoCl}_2$  for the indicated times, then total RNA extracts were subjected to RT-qPCR for the HIF-1 $\alpha$  transcript. *Cyclophilin* was used as a calibrator. **(D)** HEK 293T cells were transfected with *HIF1A*-PGL3 and pRL-TK plasmids for 24h, together with various amounts of plasmids encoding Flag-RelA, Flag-TBK1 or Flag-IKKi, then lysed and analysed for luciferase activity. The expression of the transgenes was evaluated by immunoblot analysis (not shown). **(E)** *Tbk1*<sup>+/+</sup>/*Ikbke*<sup>+/+</sup> and DKO MEFs were treated with either DMSO or Act. D for 1h, then subjected to hypoxic stress for the indicated times. HIF-1 $\alpha$  was analysed by immunoblotting on cellular extracts. **(F)** *Tbk1*<sup>+/+</sup>/*Ikbke*<sup>+/+</sup> MEFs in methionine/cysteine-depleted media were treated as in E and then subjected to hypoxic stress in the presence of 0.3 mCi/mL  $^{35}\text{S}$ -Met and  $^{35}\text{S}$ -

Cys. Lysates were treated as in Fig. 3C. Coomassie-stained IgGs are shown as IP and loading control. All experiments were done at least 3 times.

**Figure 5.** TBK1 overexpression in a heterologous model leads to HIF-1 $\alpha$  induction by increased translation. HEK 293T cells were transfected with plasmids encoding flag-HIF-1 $\alpha$  plus wild-type or dominant negative versions of tagged-IKK-related kinases in increasing doses **(A)** or fixed amounts of all tagged-IKK family members or TBK1-substrates **(B)**. Cellular extracts were analysed by immunoblotting with anti-Flag or anti-T7 antibodies, as indicated. **(C)** HEK 293T cells cotransfected with a plasmid encoding Flag-HIF-1 $\alpha$  plus an empty or a Myc-TBK1 encoding plasmid were pulsed with  $^{35}\text{S}$ -methionine and  $^{35}\text{S}$ -cysteine for 2h in the presence of  $\text{CoCl}_2$  (200 $\mu\text{M}$ ), then subjected to a chase in an excess of cold methionine and cysteine for the indicated times. Flag-HIF-1 $\alpha$  was immunoprecipitated from cellular extracts using an anti-Flag antibody and analysed for  $^{35}\text{S}$ -incorporation. **(D)** HEK 293T cells transfected with vectors encoding the indicated kinases were pulsed for 1h with a  $^{35}\text{S}$ -amino acid mixture as described above in the presence or absence of  $\text{CoCl}_2$ . Flag-HIF-1 $\alpha$  was immunoprecipitated from cellular extracts using an anti-Flag antibody and analysed for  $^{35}\text{S}$ -incorporation. All above experiments were done at least 3 times.

**Figure 6.** TBK1 acts upstream of a MEK-ERK-RSK pathway. HEK 293T cells were transfected with various amounts (500ng to 2 $\mu\text{g}$ ) of Flag-TBK1 encoding plasmid, then lysed and analysed by immunoblotting for ERK1/2 and RSK **(A)** or Akt **(B)** phosphorylations. **(C)** Serum starved *Tbkl* $^{+/+}$ /*Ikbke* $^{+/+}$  MEFs were treated with DMSO vehicle (0.1%v/v), BI-D1870 (10 $\mu\text{M}$ ), PD98059 (2 $\mu\text{M}$ ), LY294002 (30 $\mu\text{M}$ ) or MLN120B (10 $\mu\text{M}$ ) for 30 minutes and then subjected to  $\text{CoCl}_2$  (200 $\mu\text{M}$ ) stimulation for the indicated times. Cellular extracts were analysed by SDS-PAGE and immunoblotting for the indicated antibodies. **(D)** Densitometric analysis of HIF-1 $\alpha$  intensity from panel C. **(E)** *Tbkl* $^{+/+}$ /*Ikbke* $^{+/+}$  cells were treated with U0126 (10 $\mu\text{M}$ ) for 30 minutes prior to

CoCl<sub>2</sub> treatment for the indicated times. Cellular lysates were analysed by immunoblotting against HIF-1 $\alpha$  protein. **(F)** *Tbk1*<sup>+/+</sup>/*Ikbke*<sup>+/+</sup> MEFs and DKO MEFs were treated with CoCl<sub>2</sub> for the indicated times. Whole cell extracts were analysed by immunoblotting for the shown proteins. All above experiments were done at least 3 times.

**Supplemental figure 1.** TBK1 overexpression specifically induces HIF-1 $\alpha$  expression. **(A)** HEK 293T cells in 6-well plates were transfected with plasmids encoding the indicated proteins (1  $\mu$ g) together with an empty vector or a plasmid coding for Flag-TBK1-wt (1  $\mu$ g). 24h post-transfection, cells were lysed and whole cell extracts were analysed by immunoblotting for the Flag epitope. **(B)** HEK 293T cells were transfected with plasmids encoding for the wt or dominant negative versions of IKK-related kinases together with Flag-GFP, and analysed as in A.

**Supplemental figure 2.** HIF-1 $\alpha$ 's 3'-UTR is dispensable for the induction of HIF-1 $\alpha$  by TBK1. HEK 293T cells in 6-well plates were transfected with plasmids encoding either 3'-UTR-containing or 3'-UTR-less versions of Flag-HIF-1 $\alpha$  (1  $\mu$ g), together with increasing amounts of a plasmid coding for Flag-TBK1 (500ng, 1 $\mu$ g, 2 $\mu$ g).

**Supplemental figure 3.** TBK1 overexpression specifically increases endogenous TSC1 phosphorylation at serine 511, independently of IKK $\beta$ . HEK 293T cells in 6-well plates were transfected with increasing doses of plasmids encoding the indicated IKK and IKK-related kinases. 24h post-transfection, cells were lysed and whole cell extracts were analysed by immunoblotting for phospho-serine 511-TSC1, total TSC1 and Flag epitope. **Right panel.** Using a fixed amount of Flag-TBK1 wt-encoding plasmid, addition of increasing doses of Flag-IKK $\beta$  dn-encoding plasmid does not inhibit TSC1 phosphorylation by TBK1.

**Supplemental figure 4.** TBK1 expression is induced by hypoxic stress and its expression correlates with Akt and ERK1/2 phosphorylations. *Tbk1*<sup>+/+</sup>/*Ikbke*<sup>+/+</sup> and DKO MEFs were serum starved for 16h prior to stimulation with CoCl<sub>2</sub> **(A)** or DFX **(B)** for the indicated times. Cells were lysed and whole cell extracts were analysed by immunoblotting for P-Akt (Ser 473), P-ERK1,2 and P-TSC1 (S511). **(C)** Wistar rat VSMCs were serum-starved for 16h and then placed in a hypoxic chamber for the indicated time periods. Following cell lysis in triton X-100 buffer, 100 µg of whole cell extract was immunoprecipitated with anti-TBK1 antibody. Immunoprecipitated TBK1 and its phosphorylation status were assessed by immunoblotting.

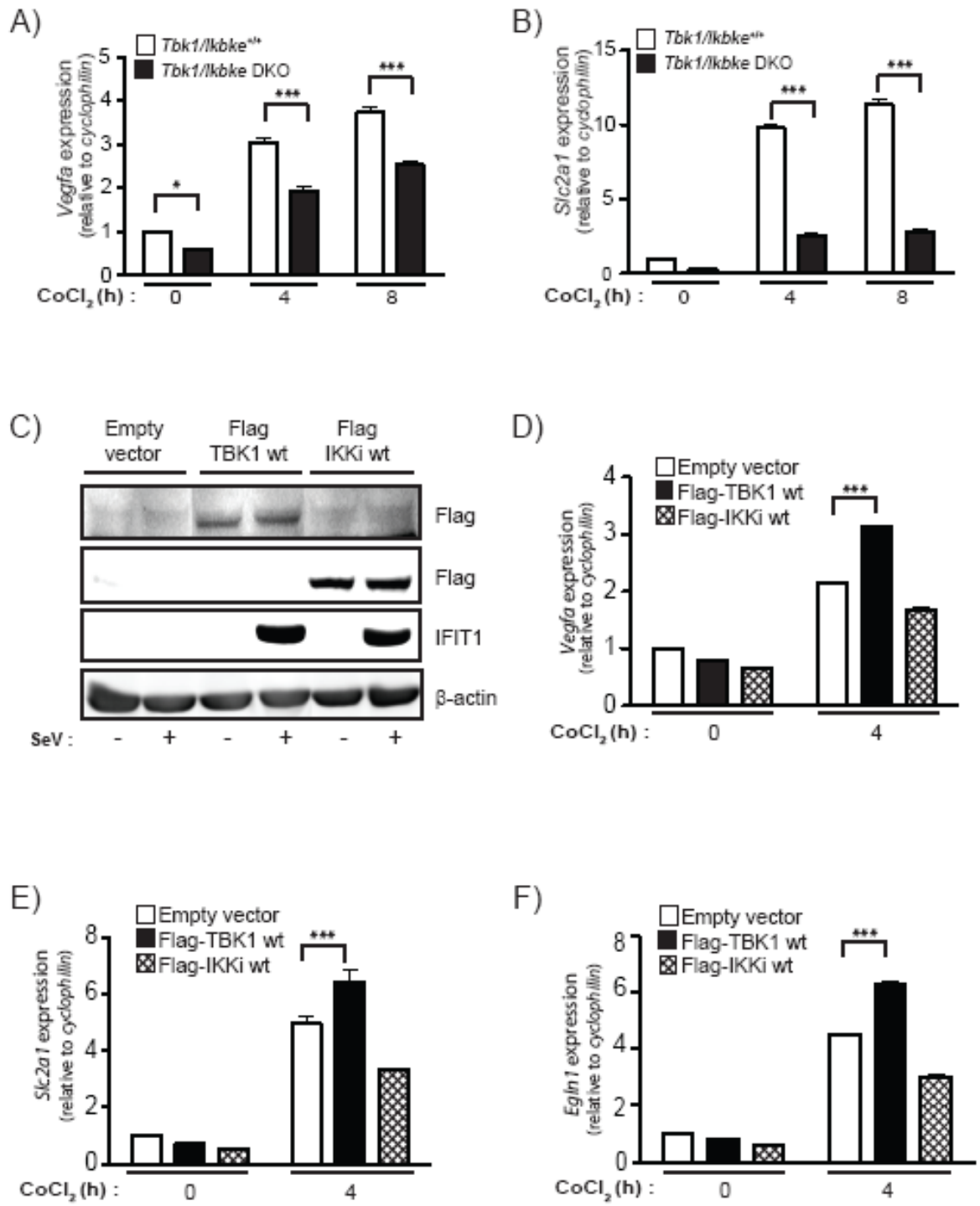


Figure 1  
Gravel & Servant

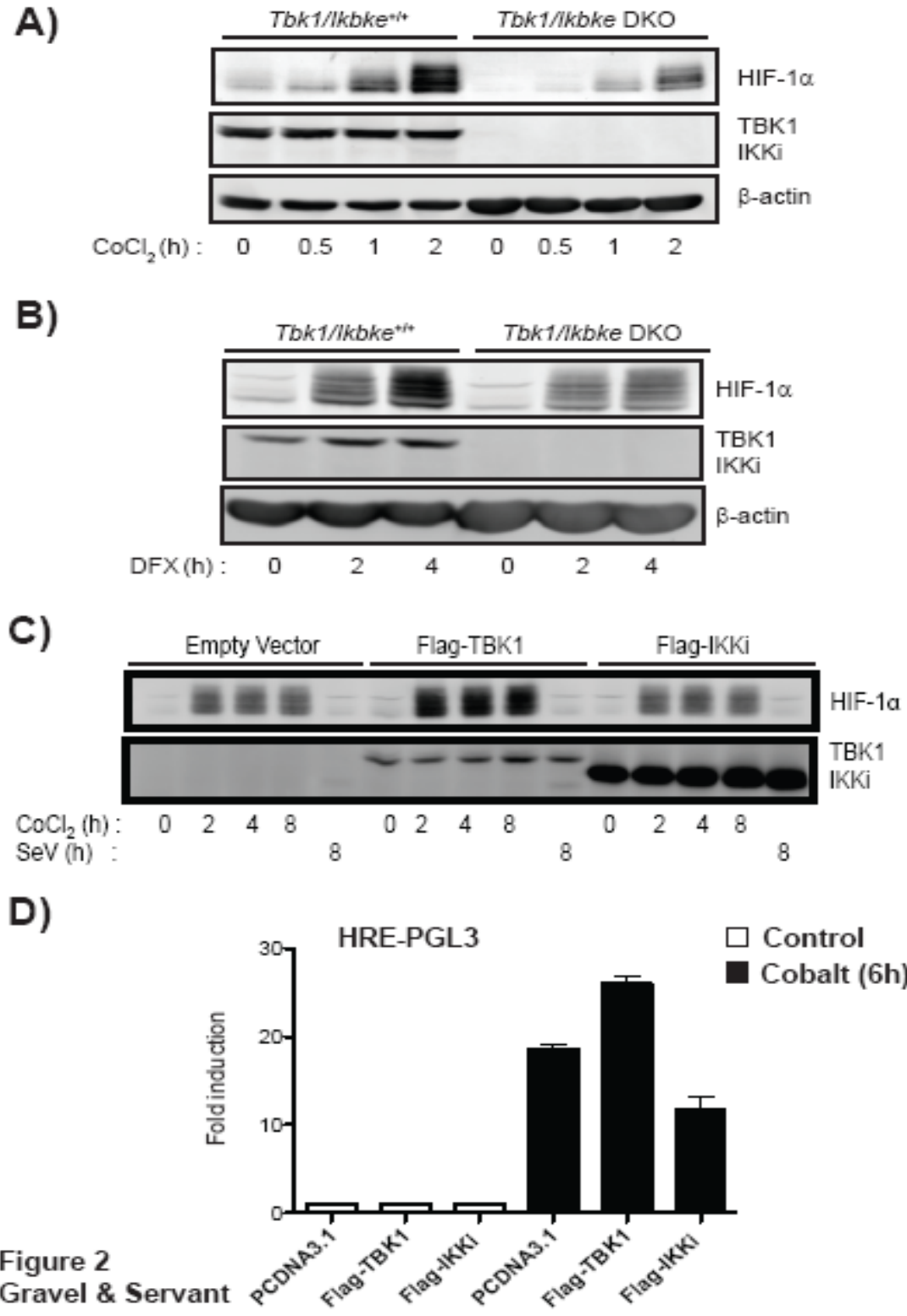


Figure 2  
Gravel & Servant

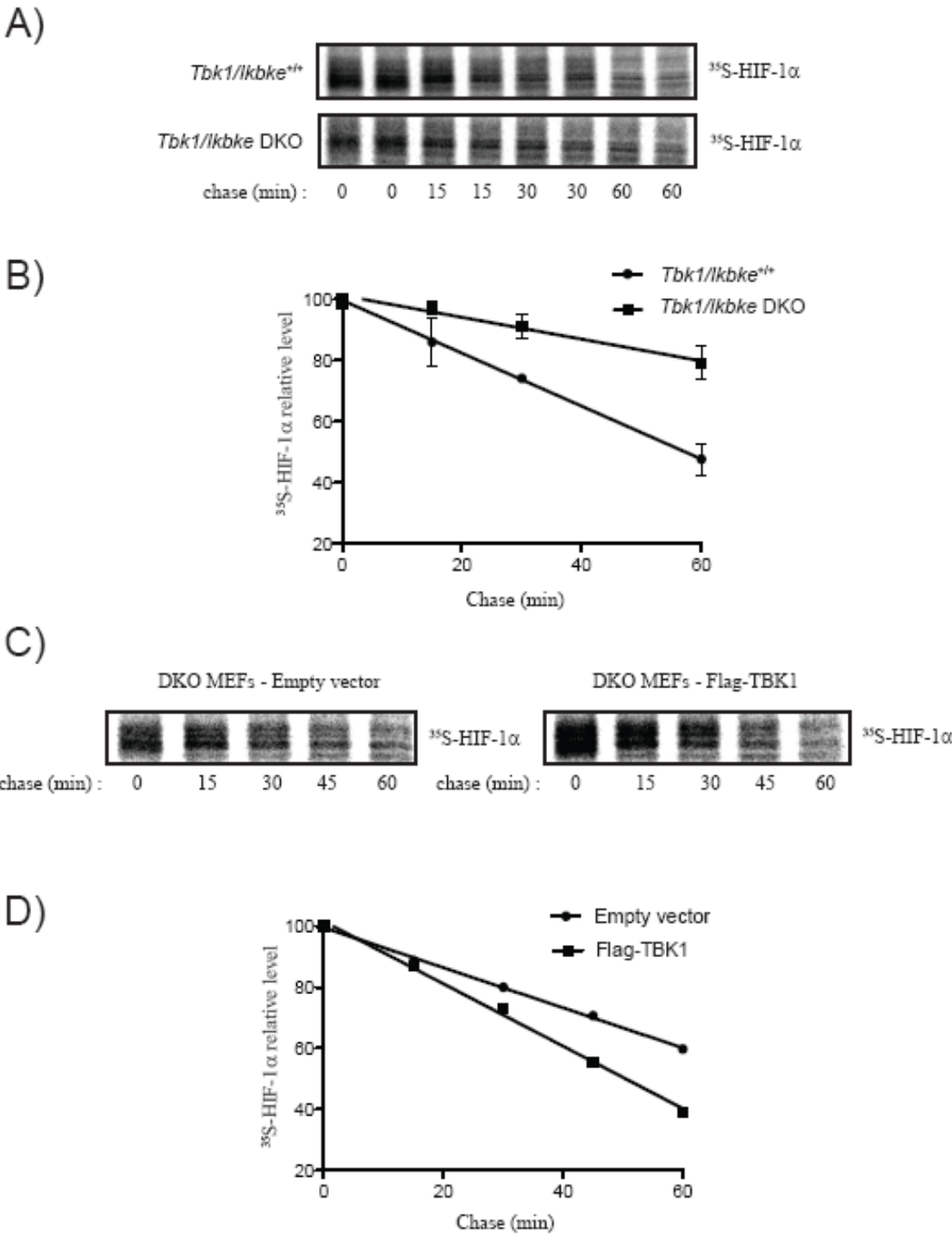


Figure 3  
Gravel et Servant

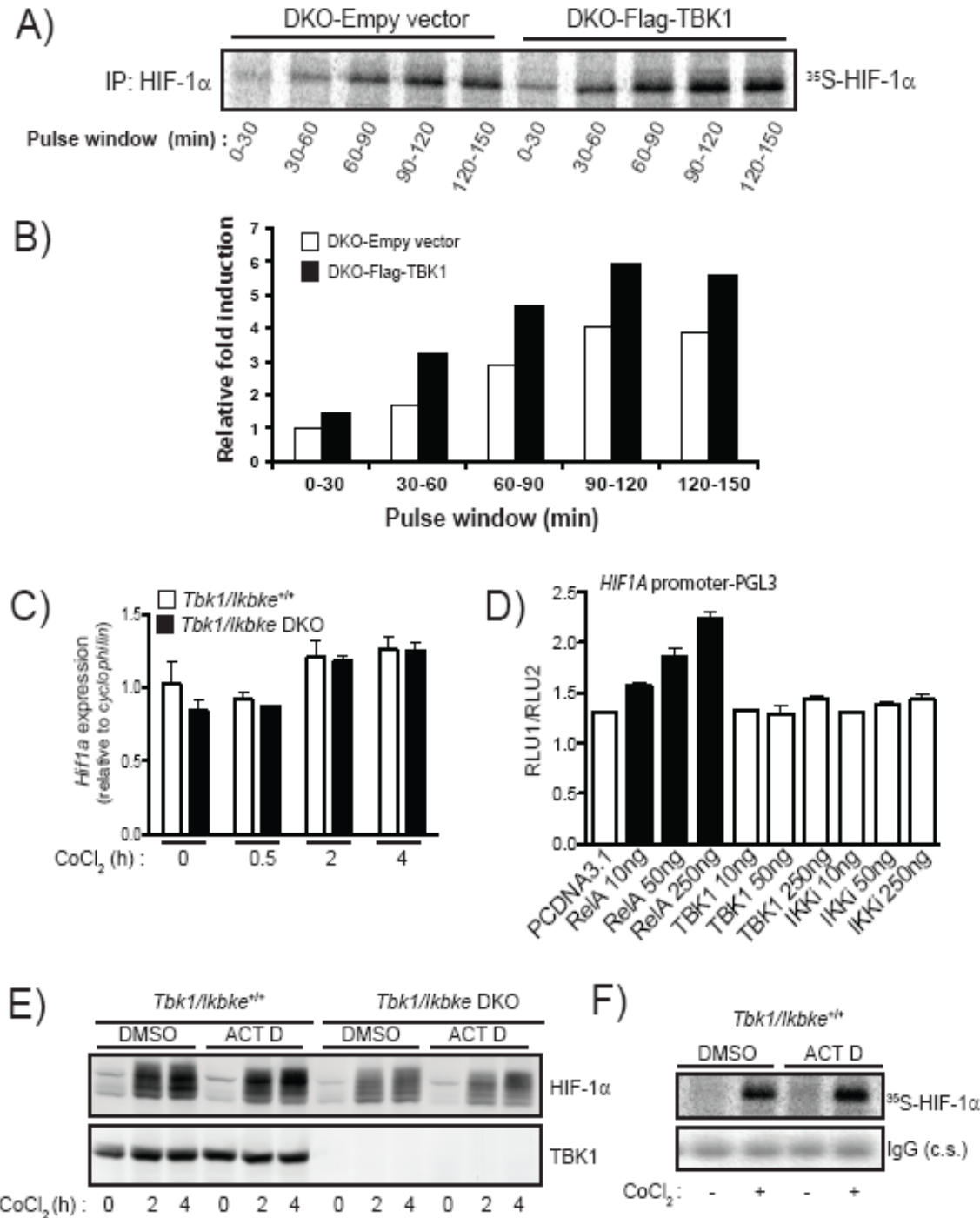


Figure 4  
Gravel et Servant



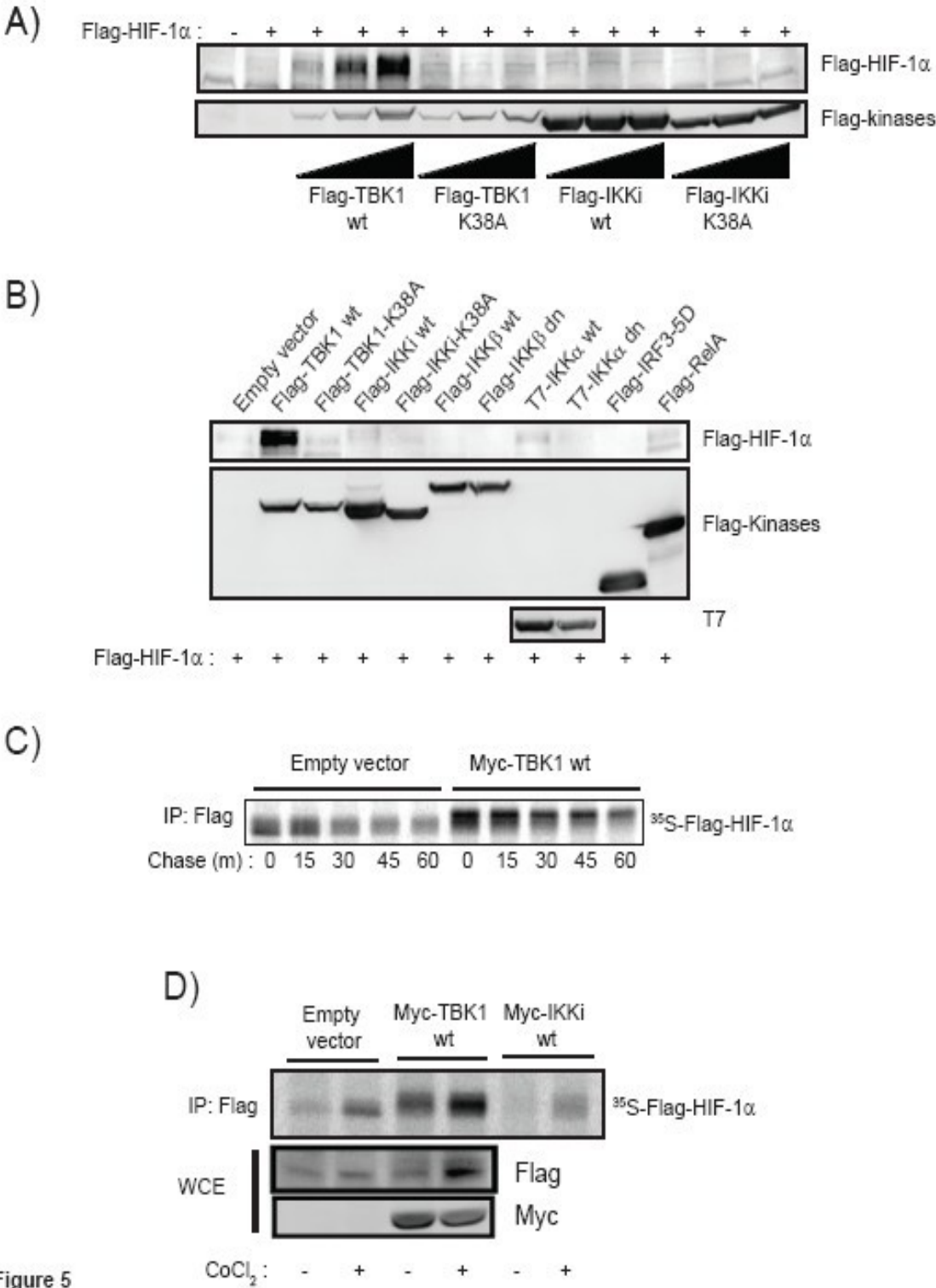


Figure 5  
Gravel & Servant

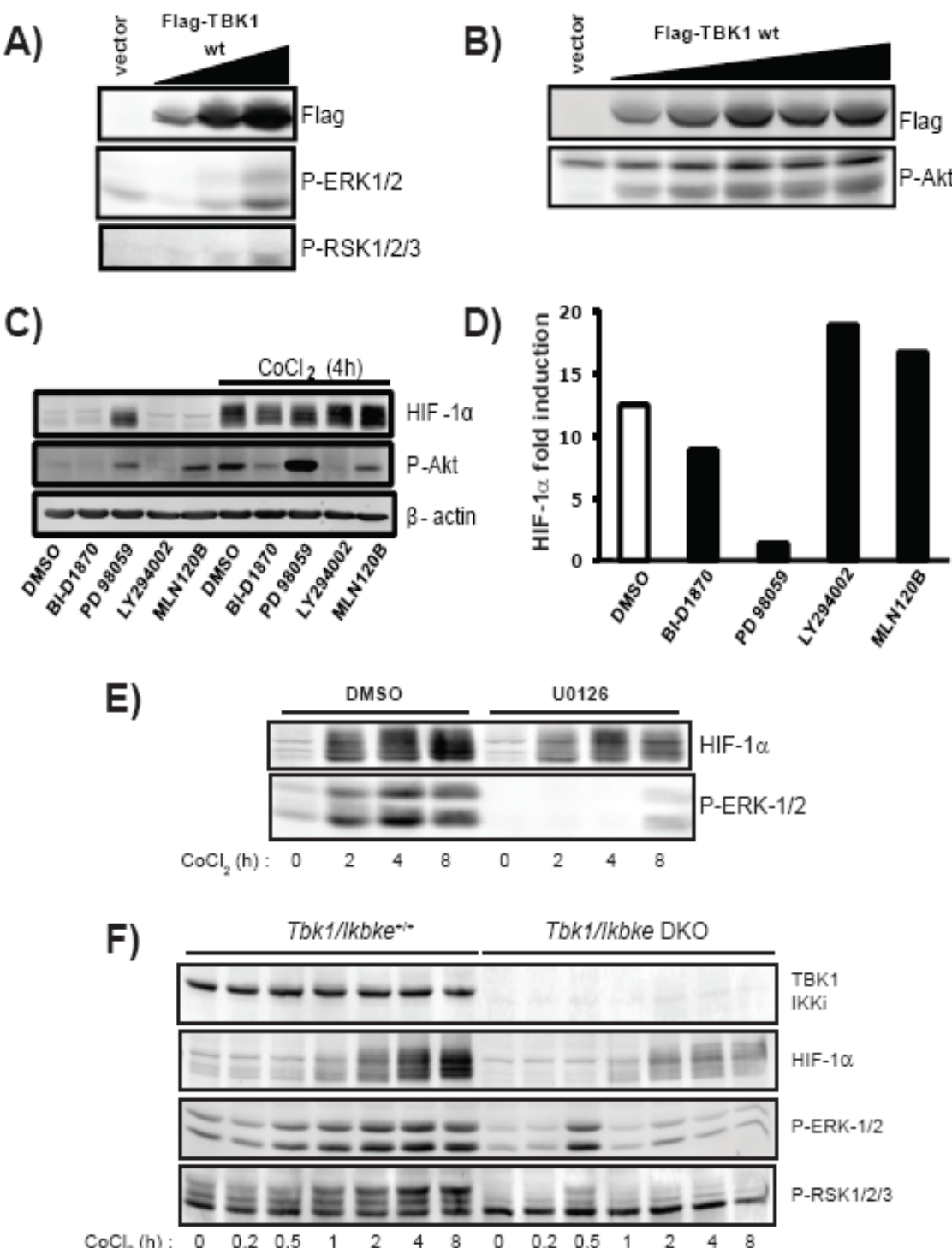
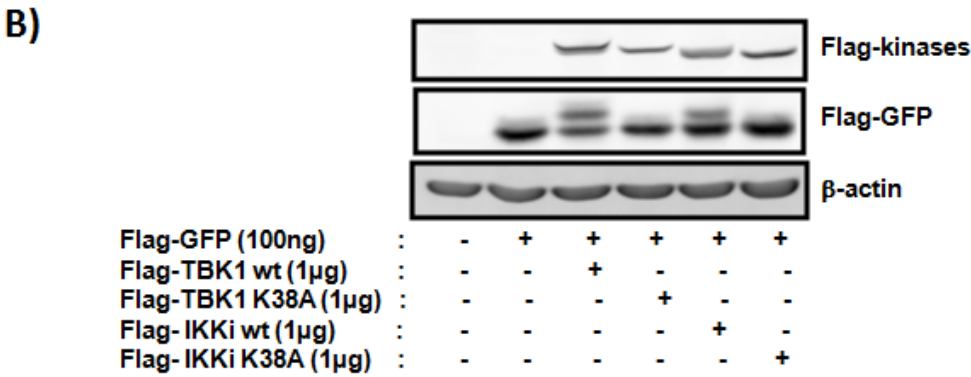
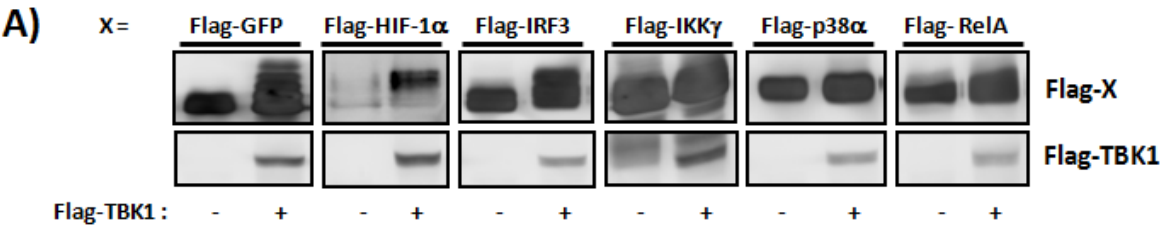
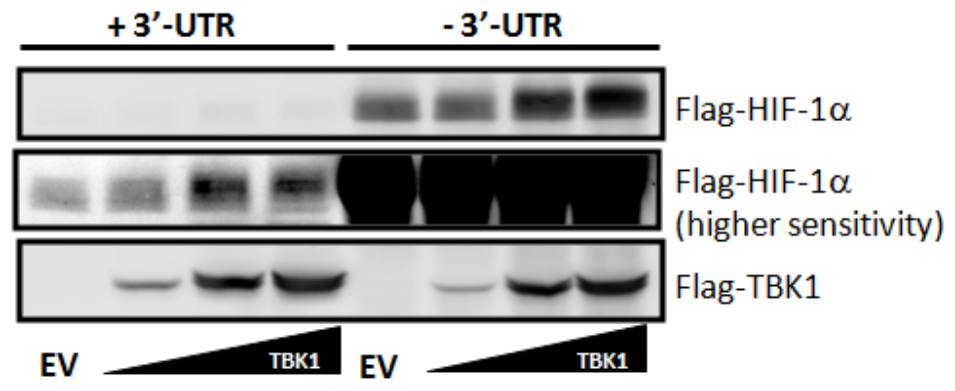


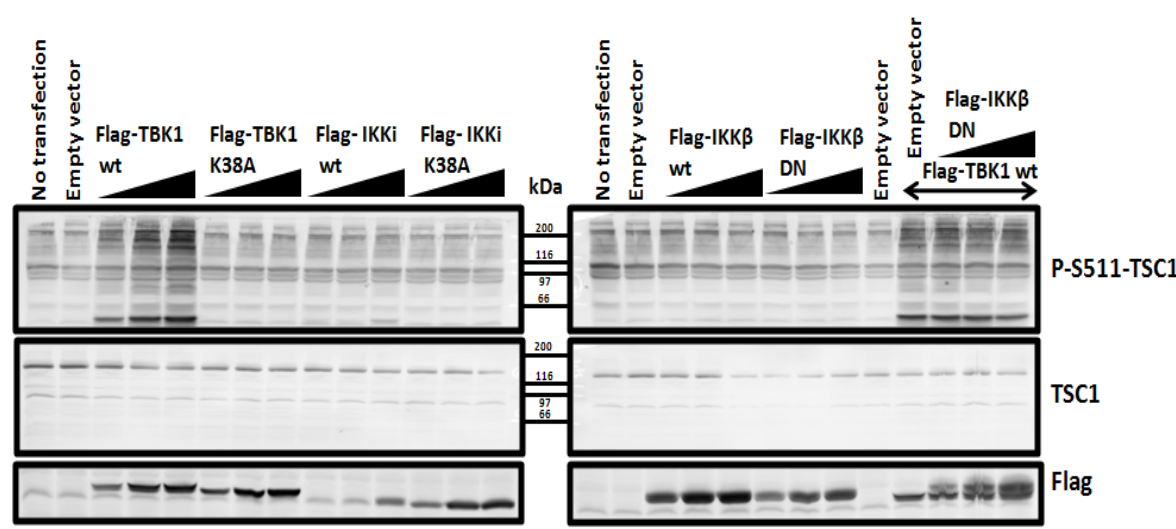
Figure 6  
Gravel & Servant



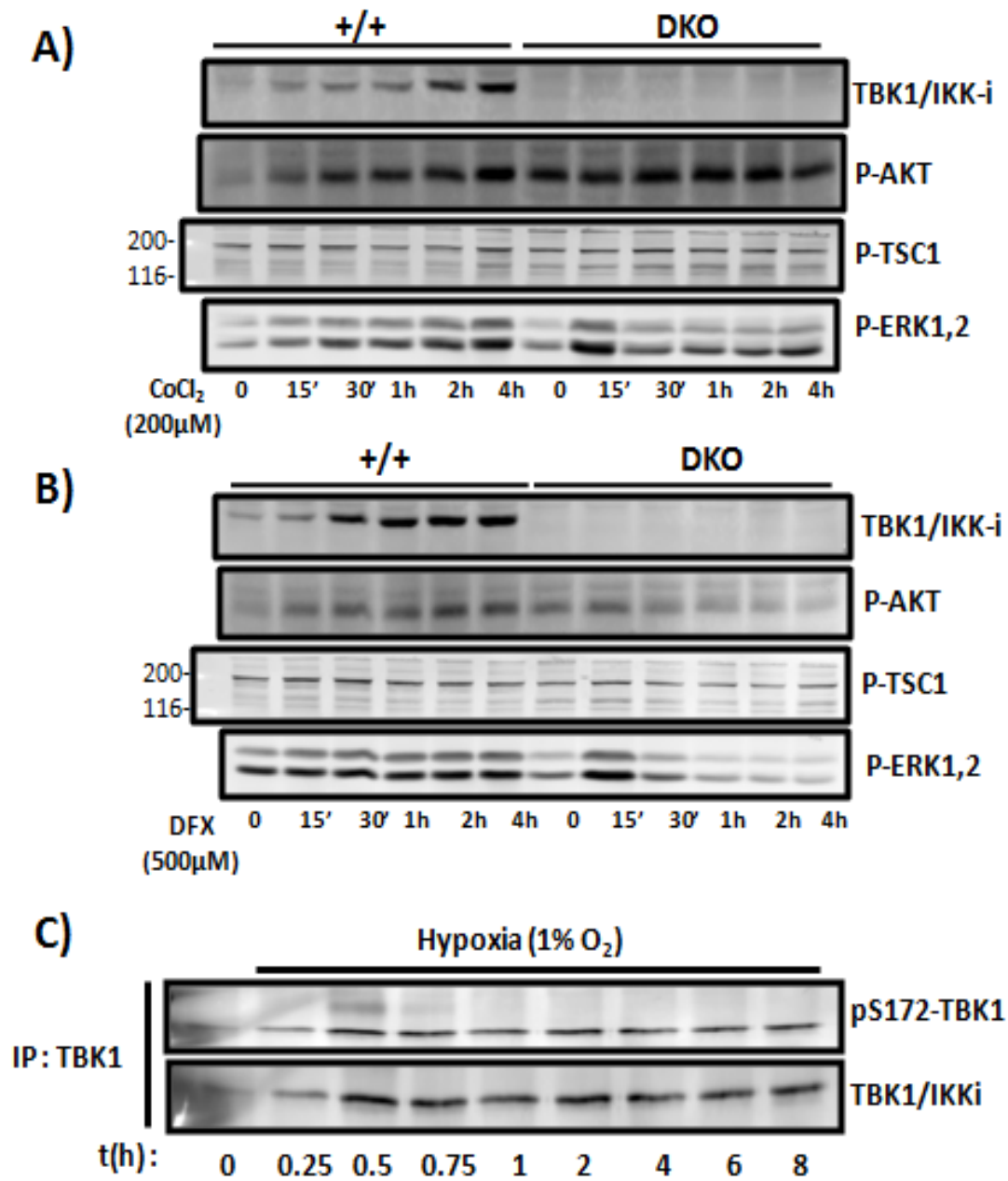
Supplemental figure 1  
Gravel & Servant



Supplemental figure 2  
Gravel & Servant



Supplemental figure 3  
Gravel & Servant

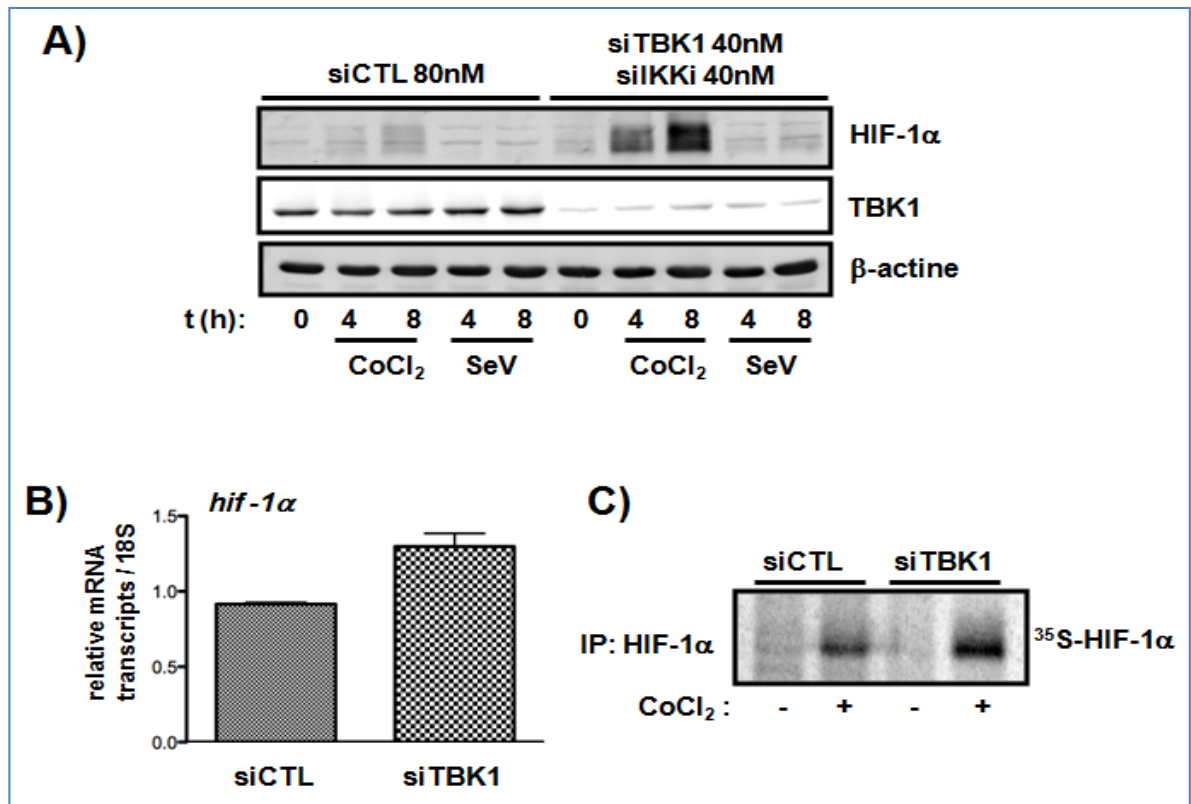


Supplemental figure 4  
Gravel & Servant

### 5.3.4 Résultats connexes

Nous avons entrepris de vérifier si d'autres techniques permettaient d'évaluer le rôle de TBK1 dans la traduction de HIF-1 $\alpha$  lors du stress hypoxique. Suivant le même protocole d'ARNi présenté dans l'article #1, nous montrons que l'ARNi dirigé contre TBK1 et IKK- $\beta$  ne diminue pas l'induction de HIF-1 $\alpha$  par le stress hypoxique dans les Hela (figure 39A) et dans les Hec-1B (Gravel SP & Servant MJ, résultats non-publiés). Au contraire, HIF-1 $\alpha$  est davantage induit lorsque l'expression de TBK1 est diminuée. Remarquons toutefois que les cellules traitées avec les duplex contrôles (siCTL) présentent une réponse anormalement faible. L'étude du messager de *HIF1A* montre que son niveau est augmenté en condition d'ARNi contre TBK1 (figure 39B). L'étude de la traduction de HIF-1 $\alpha$  durant le stress hypoxique montre également une plus forte néo-synthèse de HIF-1 $\alpha$  lorsqu'il y a diminution de l'expression de TBK1 (figure 39C). Nous proposons quelques explications à ces résultats inattendus dans la discussion à la section 6.3. Avançons ici que la technique présentée comporte trop de paramètres d'influence pour pouvoir être incluse dans les résultats originaux de l'article à soumettre. En effet, est-ce que les agents de transfection (liposomes cationiques) peuvent à eux seuls moduler la réponse hypoxique ? Également, nous privilégions une approche qui n'altère pas le taux d'ARNm de HIF-1 $\alpha$ , puisque ce dernier n'est pas modulé lors d'une cinétique d'hypoxie chimique dans nos types cellulaires à l'étude (article #3, figure 4C). Ces résultats sont toutefois importants, particulièrement en ce qui concerne les traitements futurs de maladies inflammatoires, et qui auraient pour cible les kinases IKK-related. À ce sujet, nous proposons une discussion sur les avancées dans ce domaine d'étude à la section 6.4 de la discussion.

Nous avons également entrepris d'utiliser des techniques de shRNA dirigés contre TBK1, ainsi qu'un inhibiteur de TBK1, afin de confirmer nos observations à l'aide d'autres méthodes que les siARN/liposomes et les cellules KO. Les résultats étaient cependant trop préliminaires lors du premier dépôt de cette thèse, mais ceux-ci pourront être aperçus lors de la discussion entourant la soutenance de thèse, et trouveront probablement leur place dans le manuscrit finalisé pour publication dans un journal scientifique.



**Figure 39: L'ARN interférence dirigée contre TBK1 favorise la transcription de HIF-1alpha.**

**A)** ARN interférence dirigée contre les kinases IKK-related effectuée dans les Hela pendant 3 jours, puis stimulation au CoCl<sub>2</sub> (200 $\mu$ M) ou infection au SeV (200 HAU/10<sup>6</sup> cellules) pour les temps indiqués. Le protocole d'ARNi employé est le même que celui de l'article #1. Les cellules ont été lysées et les extraits cellulaires totaux ont été analysés par SDS-PAGE, tel que décrit dans l'article #3. **B)** PCR quantitatif pour la détection du transcript *HIF1A* dans les Hela ayant été traitées à l'ARNi envers TBK1. Le résultat présenté provient de 3 échantillons biologiques évalués en duplicats. Le protocole d'extraction d'ARN, de transcription inverse et de PCR quantitatif a été décrit dans l'article #3. **C)** Marquage métabolique au S35 dans des Hela ayant été traitées à l'ARN interférence. Le marquage a été effectué après 1h30 de stimulation au CoCl<sub>2</sub> (200uM) et d'une durée de 30 minutes seulement. L'analyse du HIF-1 $\alpha$  néo-synthétisé a été effectuée tel que décrit dans l'article #3.

## 6. Discussion

Nous avons présenté dans cette thèse trois articles qui ont pour but commun de vérifier l'implication des kinases IKK et IKK-related dans les processus inflammatoires. Les résultats exposés montrent que ces kinases exercent leurs actions pro-inflammatoires par des procédés qui diffèrent, mais suggèrent qu'elles peuvent toutes être impliquées à différents niveaux du développement de maladies chroniques telles que l'athérosclérose (AT). Seule IKK $\alpha$  n'a pas été étudiée dans les 3 articles présentés, sinon que sa présence au sein du complexe IKK influence l'activité phosphotransférase de ce dernier, variable à l'étude, sans que nous lui accordions particulièrement attention (articles #1 et #2). Nous soupçonnons toutefois que cette kinase détient un rôle influent sur le contrôle transcriptionnel, notamment grâce à sa capacité de transloquer au noyau cellulaire et à modifier certaines composantes de la chromatine (section 3.1 et figure 24). Par ailleurs, certains de nos résultats révèlent de nouveaux rôles insoupçonnés et spécifiques à TBK1, ce qui ouvre la voie à une recherche future prometteuse et passionnante sur la régulation traductionnelle en condition de stress hypoxique ou d'infection virale.

Dans ce chapitre, nous allons discuter de chaque article individuellement, en soulignant l'originalité et l'importance des résultats présentés, en situant son emplacement au sein de la connaissance actuelle, et en élaborant quelques idées de recherche future. Nous discutons également de résultats originaux obtenus par le candidat en rapport à ces articles (voir résultats connexes des sections 5.1.5, 5.2.5 et 5.3.4), et ce, au fil de ses années passées au laboratoire de Marc Servant. L'immunité et l'inflammation étant des thèmes de recherche d'impact majeur<sup>48</sup> et aux retombées indiscutables, une compétitivité évidente naît entre les équipes de recherche qui abordent des thématiques similaires, ce qui génère de

---

<sup>48</sup> Le journal *Annual Review of Immunology* occupe le 5<sup>e</sup> rang de tous les journaux, toutes sciences confondues, selon le Journal of Citation Report (ISE Web of Knowledge) en 2009, avec un facteur d'impact de 37,902. Shizuo Akira, un chercheur pionnier dans le domaine de l'immunité, a déjà été reconnu pour être l'auteur le plus cité au monde [1387].



vives discussions, parfois des contradictions, mais le plus souvent contribue à un avancement effréné de la connaissance. Le lecteur appréciera particulièrement cette situation dans la discussion entourant l'article #1 sur le HCMV, où le portrait des voies de signalisation induites suivant la reconnaissance de PAMPs s'est bonifié de manière quasi-exponentielle, alors que ces connaissances étaient rudimentaires, voire inexistantes au moment de la publication de notre étude en 2005. Ceci s'applique particulièrement aux virus à ADN tels que le HCMV (section 2.4.2.2 et figure 21).

## **6.1 Discussion autour de l'article « Roles of an IkappaB kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions » (publié)**

### **6.1.1 Importance de l'étude, résultats connexes et suivi de la littérature**

La séropositivité au HCMV est très commune au sein de la population en général. Puisque celle-ci augmente avec l'âge et que le virus a la capacité, par sa nature, d'effectuer des cycles de latence et de réactivation, il a été suggéré que ce pathogène pouvait être lié au développement de maladies chroniques, telles que l'AT, d'autant plus que le CMV peut induire la formation de plaques athéromateuses dans plusieurs modèles animaux et qu'il peut établir résidence dans le tissu vasculaire. Nous avons exposé à la section 2.4.2 quelques évidences cliniques et expérimentales d'une association entre le HCMV et le développement de maladies cardiovasculaires. Bien que la morbidité et la mortalité associées à la séropositivité pour ce pathogène aient été davantage étudiées chez les individus immunocompromis (virus du SIDA ou transplantations), une revue de 89 articles publiés entre 1950 et 2007 a montré qu'il existait un lien entre une infection au HCMV et le

développement de nombreuses manifestations pathologiques, incluant les thromboses vasculaires [1388]. L'incidence d'événements cardiovasculaires liés à la séropositivité pour différents pathogènes est maintenant appuyée par la théorie du fardeau de pathogènes (*pathogen burden*), où une corrélation existe entre la sévérité de la pathologie (par exemple la maladie des artères coronaires) et le nombre de pathogènes [980, 1389] (section 2.4.2.1). Une récente étude suggère cependant que la séropositivité seule n'est pas un marqueur d'inflammation sensible, et que ce fardeau de pathogènes devrait être couplé à une évaluation des anticorps sériques anti-pathogènes [1390]. D'ailleurs, il semble exister une corrélation entre le taux d'anticorps anti-CMV et la mortalité chez les personnes âgées [1391]. Ainsi, pouvons-nous affirmer, en 2011, que le HCMV peut à lui seul être lié au développement de l'AT, indépendamment de la séropositivité pour d'autres pathogènes ? La réponse n'est toujours pas claire. Cependant, nous croyons que les études adressant le fardeau de pathogène demeurent pertinentes et devraient être réalisées éventuellement à plus grande échelle. L'impact d'un seul pathogène dans l'AT ne trouvera de la crédibilité qu'au fil de publications significatives. L'AT étant une maladie multifactorielle d'une grande complexité, les études doivent également tenir compte des différents facteurs de risque associés à sa progression. À cet effet, une importante étude a montré que le HCMV était lié à une dysfonction endothéliale, et ce, indépendamment des facteurs de risque traditionnels [974]. Nous croyons pour notre part que l'étude fondamentale des processus inflammatoires induits par le HCMV mènera à une meilleure compréhension de la pathologie qui lui est associée, ainsi qu'à la découverte de marqueurs sensibles associant sa séropositivité au développement de l'AT. Puisque le HCMV n'est pas le seul pathogène lié aux maladies inflammatoires chroniques, nos découvertes seront probablement applicables à d'autres pathogènes qui pourraient eux aussi exercer des effets pro-inflammatoires par des mécanismes semblables. Grâce aux découvertes récentes sur l'immunité innée aux pathogènes à ADNdb, que nous illustrerons dans quelques pages, le lecteur sera convaincu, nous le souhaitons, de la pertinence de notre recherche dans le contexte des maladies inflammatoires chroniques.

Notre étude a le mérite d'être la première à associer la voie TBK1/IKK-i-IRF-3 à un contexte d'inflammation chronique cardiovasculaire, et l'une des rares à adresser le rôle pro-inflammatoire des kinases IKK-related ou d'IRF-3. Rappelons que cette voie est davantage étudiée dans le strict contexte de l'immunité innée, où la synthèse d'IFNs de type I est la variable à l'étude. Compte tenu que les gènes pro-inflammatoires *CCL5* et *CXCL10* étaient connus pour être sous la dépendance de NF- $\kappa$ B et d'IRF-3 [136, 361, 1392], il nous a semblé pertinent de vérifier l'implication des voies de l'immunité innée connues à l'époque dans leur régulation. Les kinases IKK-related ont été découvertes en 1999-2000 [130, 132], cependant leur rôle essentiel dans l'immunité innée a été élucidé pendant que nous débutions en 2003 l'étude de l'activation d'IRF-3 par le HCMV dans les VSMC [1125, 1334]. Nous avons donc logiquement vérifié l'activation de ces kinases du même coup. Bien qu'il était connu depuis peu que le HCMV pouvait d'une part activer IRF-3 dans les fibroblastes [1061], et d'autre part induire l'expression de RANTES dans les cellules endothéliales ou les fibroblastes [1060, 1393], cela ne signifiait pas nécessairement que le HCMV avait la capacité d'induire la voie IRF-3-RANTES/IP-10 dans les VSMC. Il existe des différences notables entre différents types cellulaires quant à l'importance relative de certaines voies de signalisation dans le contrôle de l'expression des gènes. Un exemple frappant est celui des cellules myéloïdes, où IRF-3 et IRF-7 auraient un rôle négligeable dans la régulation de l'expression d'IFN $\beta$  [1394]. Le HCMV est par ailleurs un virus aux multiples stratégies d'évasion de la défense immunitaire de l'hôte, et particulièrement de la voie des IFNs [1395]. En 2003 et 2004, deux articles indépendants ont montré qu'une protéine du tégment du HCMV, pp65 (UL83), avait la capacité d'inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B et d'IRF-3 [1396, 1397] (section 2.4.2.2). Ces résultats ont été publiés pendant même que nous observions une forte activation de TBK1 et d'IRF-3 par le HCMV dans les VSMC humaines, ce qui nous indique qu'en dépit de sa capacité à inhiber IRF-3, le HCMV a le potentiel d'induire de manière significative l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans notre modèle cellulaire. L'étude par *cartesian array* des cytokines induites par le HCMV dans les VSMC est d'ailleurs fort éclairante à ce sujet (article #1 figure 7B). Elle nous montre que le HCMV induit dans les VSMC l'expression

de cytokines IRF-3-dépendantes (RANTES, IP-10), et dans une moindre mesure NF- $\kappa$ B-dépendantes (IL-6, IL-8). Il est toutefois possible que les cytokines IRF-3-dépendantes soient davantage induites à cause d'un synergisme connu avec NF- $\kappa$ B. Curieusement, il a récemment été montré qu'IRF-3 pouvait induire l'expression de cytokines dont les promoteurs ne contiennent pas d'élément ISRE, ce qui inclut justement ceux de l'IL-6 et l'IL-8 [1353]. Les auteurs de cette découverte suggèrent qu'IRF-3 peut contribuer à l'activation de c-Jun (section 3.3.3). Nous avons montré que le HCMV active les voies MAPK JNK, ERK et p38 dans les VSMC (article #1 figure 1). Le mécanisme par lequel HCMV induit l'activation des MAPK demeure inconnu, mais pourrait certainement être dépendant des voies de l'immunité innée (voir les figures 4, 5 et 33), puisque l'activation des MAPK suit une cinétique semblable à celle des kinases IKK $\beta$  et TBK1. En 2006, à l'aide d'une approche inhibitrice, l'équipe de Karen Mossman a montré que les voies SAPK/JNK et PI3K étaient impliquées, par un mécanisme inconnu, dans l'induction d'IFIT1/ISG56 par les virus enveloppés, ce qui inclut le HCMV [1398]. Cependant, les résultats présentés montrent que l'activation d'IRF-3, mesurée par sa dimérisation et sa translocation nucléaire, n'est pas touchée. En 2005, nous avons également effectué des prétraitements avec différents inhibiteurs des MAPK, de PI3K et de mTOR, cependant dans les VSMC humaines (résultats connexes, figure 34). Nous observions pour notre part une diminution notable de la dimérisation d'IRF-3 par le HCMV en présence du SP600125, un inhibiteur de JNK.

Quatre années après l'obtention de nos résultats préliminaires sur JNK, une étude publiée dans *Cell Research* montre qu'une voie TAK1-JNK est impliquée dans la phosphorylation d'IRF-3 en N-terminal [1327], étape antérieure à son activation par TBK1. L'étude montre entre autres que le SP600125 inhibe la dimérisation d'IRF-3 par le poly(I:C). Il est intéressant de constater qu'une autre étude, publiée quelques mois auparavant, montrait également l'implication de JNK dans l'activation d'IRF-3 par un virus à ADNdb, l'adénovirus, ce qui laisse présager que le HCMV module également l'activation d'IRF-3 via JNK [1399]. Notons que l'étude publiée dans *Cell Research* donne enfin une

réponse à la phosphorylation énigmatique d'IRF-3 en N-terminal, dont la kinase inconnue était recherchée depuis 2001 [1320]. L'ensemble de ces résultats nous montre que la voie d'activation d'IRF-3 est intimement liée à celle du stress. L'étude de conditions menant à une activation synergétique de ce facteur de transcription en condition d'inflammation chronique nous semble donc tout à fait pertinente. Nous reviendrons à ce sujet d'étude sous peu.

Au moment de la publication de nos travaux, les mécanismes de l'immunité innée impliqués dans l'activation d'IRF-3 par HCMV n'étaient pas bien caractérisés (figure 21). Deux avenues possibles se présentaient alors à nous. La première était que la reconnaissance des virions par des récepteurs cellulaires pouvait mener à l'activation de voies de l'immunité innée, probablement par l'intermédiaire de PRRs. Le récepteur de l'EGF venait d'être identifié comme récepteur d'entrée du HCMV [998], et une voie sensible à PTx, donc probablement un GPCR, était impliquée dans l'activation de NF- $\kappa$ B par ce virus dans les VSMC (section 2.4.2) [1056]. La glycoprotéine B du HCMV, un PAMP reconnu par TLR2 [71], avait peu de chance d'activer IRF-3, puisque ce PRR ne procède pas par TRIF. De nouveaux PRRs, possiblement exprimés à la surface cellulaire des VSMC, pouvaient donc être impliqués dans la reconnaissance du HCMV. La deuxième avenue était que l'activation de ces voies se produisait à l'intérieur des cellules, par un procédé qui dépendait ou non de la réplication du virus. Les virus à ADNdb ne sont pas connus pour produire des intermédiaires de réplifications tels que les ARNdb, fortement immunogènes. Il est tout de même envisageable que certains ARN viraux synthétisés dans la cellule infectée, ou transportés de manière plus ou moins spécifiques par les virions (section 2.4.2.2), forment des structures doubles brins aux propriétés immunostimulantes.

À l'aide d'une approche pharmacologique (l'inhibiteur AG-1478), d'un anticorps neutralisant et l'utilisation d'une version mutante de l'EGFR, nos résultats montrent que la présence ou l'activité de ce récepteur n'est pas impliquée dans l'activation d'IRF-3 par le HCMV dans les VSMC (article #1 figure 9). Ceci était surprenant, puisque les auteurs qui avaient identifié ce récepteur comme étant celui d'un récepteur d'entrée du HCMV

montraient que l'utilisation d'AG-1478 bloquait l'entrée du virus [998]. En réponse à cet article, une étude très élaborée menée par Teresa Compton montra 3 ans plus tard que le récepteur de l'EGF n'était pas requis pour l'entrée du HCMV, et ce, pour différents isolats du HCMV et dans de nombreux types cellulaires [997], sans toutefois parvenir à expliquer cette conclusion diamétralement opposée. Pour vérifier le rôle de la voie sensible à PTx dans l'activation d'IRF-3 par le HCMV dans les VSMC, nous avons simplement effectué un prétraitement des cellules avec la PTx avant l'infection. Les résultats obtenus montrent clairement que nos approches inhibitrices, bien qu'efficaces (article #1 figure 9A), ne parviennent pas à bloquer l'activation de TBK1 et d'IRF-3. Comment expliquer dans ce cas l'étude publiée dans le *Journal of Clinical Investigation* en 1997 qui suggère qu'un récepteur couplé à Gi/o mène à l'activation de NF- $\kappa$ B dans les VSMC infectées aux HCMV [1056] ? À l'heure actuelle, peu ou pas de GPCR sont reconnus pour être impliqués dans l'entrées des virus. HIV-1 utilise entre autres CCR5, le récepteur de RANTES, comme corécepteur d'entrée (revu dans [1400]). Or, le HCMV encode pour un récepteur à chimiokines, l'US28, qui est couplé à Gi et qui active NF- $\kappa$ B (section 2.4.2.4). Nous avons analysé l'induction d'US28 par RT-PCR dans les VSMC infectées au HCMV (Gravel SP & Servant MJ, résultats non publiés). US28 est induit en quelques heures suivant l'infection au HCMV, selon une cinétique similaire à celle de l'activation d'IRF-3. Ainsi, le HCMV induit probablement tardivement la voie NF- $\kappa$ B d'une manière US28-dépendante, mais d'autres mécanismes peuvent être à l'origine de cette activation, tel que discuté à la section 2.4.2.4.

Puisque la reconnaissance immunitaire du HCMV ne semblait pas être effectuée par le récepteur de l'EGF ou un GPCR couplé à Gi/o, nous avons testé la seconde avenue, soit l'induction intracellulaire de TBK1-IRF-3. Notons cependant que nos résultats n'excluent pas l'existence d'autres récepteurs membranaires du HCMV, ce qui sera d'ailleurs abordé sous peu. Nos résultats montrent que la cycloheximide (CHX) ne bloque pas la phosphorylation d'IRF-3 et sa dimérisation (article #1 figure 4), ni sa capacité à lier l'ADN (article #1 figure 5A). Ceci suppose que la traduction de gènes viraux et/ou cellulaires n'est

pas impliquée dans l'activation d'IRF-3 par ce virus. Nous assistons en fait à une augmentation évidente de l'activation d'IRF-3 en présence de CHX. Il est tout à fait possible que des gènes viraux utiles à l'évasion virale (ex : pp65, tel que discuté précédemment) ou des gènes cellulaires agissant comme atténuateurs de la réponse immunitaire, soient induits durant l'infection au HCMV, ce qui explique l'effet potentialisateur de CHX. Cependant, l'utilisation de CHX ne nous indique pas si l'activation de la voie TBK1-IRF-3 dépend de la capacité du virus à amorcer sa réplication. Nos résultats supposent que la reconnaissance d'un PAMP du HCMV a lieu suite à l'entrée virale, soit entre 2 et 4h post-infection (voir article #1 figure 2A), et précède toute induction traductionnelle en réponse à l'infection. Suivant la publication de notre étude, nous avons tenté de répondre à cette hypothèse en utilisant un virus inactivé aux ultraviolets (UV) ainsi qu'un inhibiteur de la transcription, l'actinomycine D (résultats connexes, figure 35). Ces expériences combinées montrent clairement que la réplication du HCMV n'est pas impliquée dans l'activation d'IRF-3, et suggèrent que les effecteurs en amont de TBK1 dépendent de voies initiées lors de la reconnaissance des particules virales ou du génome du HCMV. Rappelons que ce génome est constitué d'ADNdb, mais que le virus peut également être porteur d'ARNs.

Pour terminer cette section, nous aimerions aborder un thème pertinent dans le cadre de l'étude de l'inflammation chronique : le synergisme des inducteurs de l'inflammation. Tel qu'illustré tout au long de l'introduction de cette thèse, la littérature abonde en matière de synergismes : une combinaison de différents PAMPs, de différentes cytokines, ou un mélange des 2 peuvent contribuer à amplifier la réponse inflammatoire. Une partie de nos recherches visaient donc à vérifier si certains agents cardiovasculaires pouvaient amplifier l'activation d'IRF-3 par des pathogènes viraux. En 2006, en utilisant les gels natifs pour détecter sensiblement l'activation d'IRF-3 par le HCMV, nous avons effectués différents prétraitements de 30 minutes à l'aide de l'AngII, l'insuline, l'EGF et le PDGF avant d'infecter les cellules avec le HCMV. Aucun de ces agents ne modifiait de manière apparente la dimérisation d'IRF-3 par le HCMV (Gravel SP & Servant MJ, résultats non publiés). Nous observons toutefois qu'ils modifient souvent le profil de phosphorylation

d'IRF-3, ce qui suggère une phosphorylation en N-terminal de ce dernier, probablement effectuée par JNK [1327]. Cependant, un prétraitement de 16h au PDGF, contre toute attente, avait la capacité de bloquer complètement l'activation d'IRF-3, de même que l'induction des gènes *Ccl5* et *Cxcl10* (figure 36A). HCMV est reconnu pour moduler la voie PDGF (section 2.4.2.4), cependant, rien n'était connu quant au rôle du PDGF dans l'immunité au HCMV. Afin de vérifier si le PDGFR était un récepteur potentiel du HCMV, nous avons vérifié si un prétraitement de 16h au PDGF bloquait la synthèse de gènes viraux (figure 36B). Nous observions en effet une inhibition complète de la synthèse d'*US28* dans les échantillons de cellules prétraitées au PDGF. En 2008, 2 ans après notre découverte, une étude publiée en *Nature* montre que le PDGFR est bel et bien un récepteur du HCMV [1401]. Les intégrines ont également été reconnues comme corécepteurs du HCMV [995, 1402]. Bien que notre étude de synergismes ne nous ait pas menés là où nous espérions, nous reconnaissons que les récepteurs du HCMV ne sont toujours pas caractérisés dans les VSMC, et l'impact de différents traitements sur l'expression de ces récepteurs ainsi que sur l'activation des voies de l'immunité innée et de l'inflammation reste à évaluer à l'aide de techniques très sensibles (ex : qPCR).

### 6.1.2 En quête des effecteurs en amont de TBK1 en réponse au HCMV

Peu de temps après la publication de notre étude, 4 articles majeurs relataient la découverte d'un nouveau membre de l'immunité innée, MAVS/IPS-1/VISA/CARDIF (VISA, figures 5 et 33), une molécule exprimée aux membranes mitochondriales et peroxysomiales [1403]. Bien que le processus d'activation de VISA ne soit pas encore bien défini, on reconnaît que cette molécule contribue à la formation d'une véritable « plateforme », pour reprendre le terme de Lin *et al.* [1404], qui dicte l'activation d'IRF-3, de NF- $\kappa$ B et des MAPK. Cet adaptateur avait été initialement caractérisé comme étant important dans la signalisation induite par RIG-I ou MDA5, donc dans l'immunité envers différents virus à ARN. En 2006, l'équipe de Shizuo Akira montre que l'ADNdb (forme B)

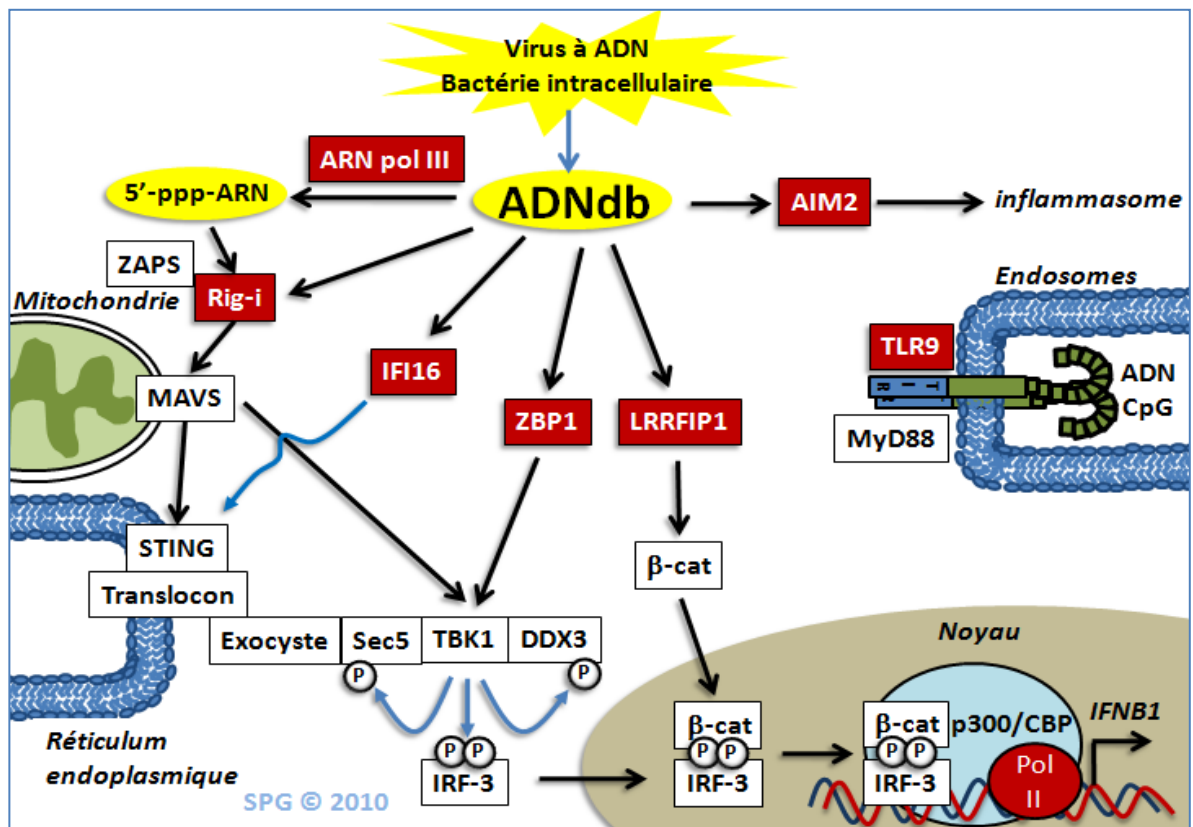


induit la voie TBK1-IRF3-IFNs d'une manière indépendante de Rig-i et des TLRs. Cependant, VISA est impliqué dans ce processus [1405]. Une étude publiée la même année stipule au contraire que l'ADNdb cytosolique induit effectivement la voie IFN, mais ne signale pas par l'intermédiaire de VISA [1406]. Cette discordance s'explique probablement par les types cellulaires utilisés dans les différentes études, des HEK293 pour la première, des MEFs et des BMDM pour la seconde. L'histoire se complique avec une étude (que nous pourrions qualifier d'avant-gardiste) qui montre de manière convaincante que l'ADNdb cytosolique nécessite Rig-i et VISA pour induire les IFNs dans les cellules Huh-7 [1407], ce qui peut sembler contre-intuitif sachant que Rig-i n'était pas caractérisé à l'époque pour reconnaître l'ADNdb. Nous avons donc entrepris de vérifier l'implication de VISA dans l'activation d'IRF-3 par le HCMV dans des fibroblastes humains MRC5. Tel que présenté à la figure 37, le HCMV induit toujours l'activation d'IRF-3 lorsque l'expression de VISA est ciblée par ARN interférence. Cependant, la phosphorylation d'IRF-3 est moindre, et sa dimérisation semble retardée dans le temps. Ceci suggère que VISA est impliqué dans l'immunité innée au HCMV, mais que d'autres voies existent et peuvent pallier à ce manque. Alors qu'aucun senseur de l'ADNdb n'était connu au moment de notre étude (outre le TLR9 endosomal, tableau 1 et figure 4), on compte depuis 2007 la découverte de 5 senseurs de l'ADNdb aux rôles variés, dont plusieurs contribuent à l'activation de la voie TBK1-IRF-3.

L'étude de pathogènes bactériens cytosoliques tels que *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* et *Trypanosoma cruzi* mena à la recherche d'un senseur de l'ADNdb cytosolique ayant la capacité d'induire la réponse IFN [1408]. Le premier senseur de l'ADNdb identifié (en 2007) et ayant ces propriétés fut DAI/ZBP1/DLM-1 (ZBP1), une protéine initialement reconnue pour lier l'ADNdb (forme Z), mais dont le rôle était inconnu [1409]. Cependant, l'existence d'autres senseurs de l'ADNdb a vite été suspectée, puisque la déficience en ZBP1 n'abrogeait pas l'induction des IFNs dans certains types cellulaires [1410, 1411]. Différents NLRs (section 1.3.2.4) ont alors été reconnus pour être impliqués dans la réponse immunitaire à l'ADNdb, tel que NALP3 [1412] et AIM2 [1413-1415], ce dernier ayant la capacité de lier directement l'ADNdb. Cependant, ces NLRs ne mènent pas

à l'activation d'IRF-3, mais bien à celle de l'inflammasome. En 2009, 2 équipes montrent que l'ARN polymérase III (ARN pol III) cytoplasmique est un senseur de l'ADNdb [1416, 1417]. L'ARN pol III génère à partir de l'ADNdb de l'ARNsb qui comporte 3 phosphates en 5' (5'-ppp-ARN) et qui est un substrat de Rig-i [1418], ce qui complète en quelque sorte l'étude de Francis Chisari mentionnée précédemment. Il est également suggéré à ce moment que Rig-i peut lier directement l'ADNdb [1419], phénomène dont l'importance restera à confirmer. En 2010, deux nouveaux senseurs de l'ADN ont été découverts. Le premier est LRRFIP1, une molécule qui n'est pas nécessaire en soi à l'activation d'IRF-3, mais qui contribue à son activation par un mécanisme impliquant la  $\beta$ -caténine [1359]. Le second est IFI16, une molécule PYHIN (comme AIM2), qui est quant à elle une inductrice importante voire essentielle de la voie IFN, notamment suite à une infection avec un virus à ADNdb tel que le HSV-1 [1357]. Les auteurs de cette étude suggèrent la création d'une nouvelle famille de PRRs, les AIM2-like receptors (ALRs). Nous avons illustré à la figure 40 les nouveaux récepteurs de l'ADNdb et avons également intégré quelques nouveaux acteurs de la réponse IFN.

Parmi ces nouveaux acteurs de l'immunité innée, outre VISA que nous avons déjà mentionné, nous retrouvons STING/MITA/ERIS/MPYS (STING), l'exocyste, le translocon et DDX3X/DDX3 (DDX3) (voir tableau 12). L'exocyste a été abordé brièvement à la section 3.4 de l'introduction, et plus particulièrement sa composante Sec5. De récents développements suggèrent que STING et DDX3 sont impliqués dans la réponse immunitaire au HCMV [1420]. STING est une molécule ubiquitaire exprimée au niveau du réticulum endoplasmique, et en contact étroit avec les mitochondries (et donc probablement avec VISA également). STING est important dans l'activation de la voie IRF-3-IFNs, autant par les virus à ARN (via Rig-i) que par les pathogènes à ADNdb, mais n'est cependant pas impliqué dans les voies associées aux TLRs (revu dans [1421]). Suivant un traitement à l'ADNdb, STING, Sec5 et TBK1 se retrouvent au niveau de vésicules périnucléaires [1107]. STING interagit avec le complexe TRAP, et ce dernier interagit avec le translocon. Or, le translocon a été reconnu pour interagir avec l'exocyste [1422].



**Figure 40 : PRRs et quelques molécules impliquées dans l'activation de la voie TBK1-IRF-3-IFNB1 par l'ADNdb.**

Cette figure résume les découvertes récentes sur la signalisation induite par l'ADNdb cytosolique. La reconnaissance de l'ADN riche en CpG a plutôt lieu dans les endosomes et n'active pas IRF-3. Au cours des dernières années, il a été découvert que différentes organelles étaient impliquées dans la réponse immunitaire innée : la mitochondrie [191], les peroxysomes (non-illustrés) [1403] et plus récemment, le réticulum endoplasmique [1423]. La recherche actuelle tente de découvrir de nouvelles molécules exprimées à la surface de ces organelles (ex : Tom70, non-illustré [1424]), ou de nouveaux acteurs cytosoliques (ex : ZAPS [1425]) qui sont impliqués dans la réponse IFN. L'importance relative de ces molécules reste à être évaluée dans le cadre d'une reconnaissance de l'ADNdb. Nous référons le lecteur au tableau 12 pour des références importantes concernant la découverte et/ou la caractérisation de ces nouveaux acteurs de l'immunité innée. Abréviations : β-cat : β-caténine; P : phosphate; ARN pol III : ARN polymérase III. Se référer la liste d'abréviations placée en début d'ouvrage.

Senseur de l'ADNdb ou molécule impliquée	Pathogènes et inducteurs	Types cellulaires impliqués
<b>DAI/ZBP1/DLM-1</b>	B-DNA, ADN viral, bactérien et de mammifère [1409], Poly(dA:dT) [1411], UV-HCMV [1420], B-DNA, ISD [1410]	L929 [1409], L929, pas significatif dans les MEFs [1410], L929, pas dans les cellules humaines [1411], THF [1420]
<b>ARN pol III</b>	Poly(dA:dT) [1416, 1417], HSV-1, Adenovirus, <i>L. pneum.</i> [1417],	293, Raw264.7 [1417], MoDCs [1416]
<b>DDX3X/DDX3</b>	Listeria, Poly(I:C), LPS [1128], TBK1, IKK-i, SeV, Poly(I:C) [1127], UV-HCMV [1420]	Raw264.7 [1128], 293 [1127], THF [1420]
<b>STING/MITA/ERIS/MPYS</b>	Poly(dA:dT), Poly(I:C), SeV [1426] Listeria (c-di-(A/G)MP) [1427] VSV, SeV, B-DNA, ISDR, ISD, Listeria, HSV-1, ADNdb variés [1107, 1423], SeV [1131], HCMV, baculovirus [1107], UV-HCMV [1420] dsVACV [1357],	293 (surexpression) [1131, 1423, 1426] Mφ [1427] MEFs, BMDM, GM-DC [1107, 1423] 293, Huh7 [1131], THF [1420]
<b>Complexe TRAP (TRAPβ, SEC61β)</b>	ISD [1107], STING [1423]	MEFs [1107] 293 [1423]
<b>Sec5/EXOC2</b>	ISD, HSV-1 [1107] SeV, poly(I:C) [1355]	MEFs [1107] HBEC [1355]
<b>IFI16 (p204)</b>	dsVACV, ADN de HSV, HSV-1 [1357]	RAW264.7, MEFs, BMDM [1357]
<b>LRRFIP1</b>	Poly(dA:dT); Poly(dG:dC), Poly(I:C), VSV, Listeria [1359]	Mφ [1359]

**Tableau 12 : Molécules impliquées dans la réponse interféron suite à la reconnaissance d'ADNdb.**

Nous avons omis les RLRs et VISA, décrits au chapitre 1 (voir le texte au sujet de Rig-i). Abréviations. B-DNA : ADN de forme B; ISD : *non CpG containing IFN Stimulatory DNA*; ISDR : *ISG nucleotide sequence*; dsVACV : ADN du virus de la vaccine; THF : HFF transfectés avec la télomérase [1428] ; MoDC : *primary human monocyte-derived DCs* ; BMDM : *bone marrow derived macrophages*; GM-DC : *bone marrow derived dendritic cells* ; *L. pneum.* : *Legionella pneumoniae* ; Listeria : *Listeria monocytogenes* ; 293 : HEK293/293T; Mφ : macrophages.

Ainsi, la réponse immunitaire innée se révèle être chez les eucaryotes d'une étonnante complexité : elle implique de multiples organelles et des translocations dynamiques où participent des vésicules peu ou pas caractérisées. Rappelons au lecteur que plusieurs organelles détiennent un rôle important dans l'inflammation et l'apoptose (section 1.3.1.2). Bien que le rôle de la localisation périnucléaire de ce nouveau « complexe immunitaire » ne soit pas encore connu, nous pouvons croire que son association au noyau permet la phosphorylation et l'entrée nucléaire d'IRF-3 de manière hautement efficace. Lors d'expériences antérieures, nous avons observé que TBK1 se retrouvait dans les fractions nucléaires des fibroblastes MRC-5 (protocole identique à celui employé dans l'article #2). Suivant une infection au SeV ou au HCMV, nous observons une induction de l'activité phosphotransférase de TBK1, autant dans le compartiment cytosolique que dans le compartiment nucléaire (Gravel SP & Servant MJ, résultats non publiés). Cela laisse croire que nos préparations nucléaires contenaient des structures membranaires associées telles que le réticulum endoplasmique, l'exocyste ou les vésicules périnucléaires.

DDX3 est une hélicase ubiquitaire qui a des rôles multiples au niveau de la traduction, le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose (revu dans [1429]). De manière importante, IKK-i [1127] et TBK1 [1128] peuvent interagir avec DDX3, et la dernière le phosphoryle (voir figure 40). Le mécanisme par lequel DDX3 est impliqué dans l'activation d'IRF-3 reste obscur, mais il a été montré que cette hélicase était recrutée au niveau du promoteur d'IFN $\beta$ , où elle agit probablement en tant que cofacteur transcriptionnel [1127].

Ainsi, à l'aide d'une approche ARN interférence, DeFilippis VR *et al.* ont suggéré que ZBP1, STING et DDX3 étaient importants dans la réponse IFN induite par le HCMV, alors que VISA ne l'était pas [1420]. Cependant, les cellules utilisées dans l'étude sont des fibroblastes immortalisés, ce qui pourrait ne pas être physiologique puisqu'il existe des différences notables quant au rôle effectif des acteurs de l'immunité innée tels que VISA selon la lignée cellulaire utilisée ou le passage cellulaire (voir discussion de [1417]). De plus, l'utilisation exclusive de l'UV-HCMV et d'essais rapporteurs *IFNB1* comme

techniques d'étude principales laissent croire que d'autres scénarios sont possibles. IFIT16, RIG-I et l'ARN pol III, par exemple, pourraient contribuer à l'activation de la voie TBK1-IRF-3-IFNs. Pour illustrer l'état actuel des connaissances au sujet de ces nouveaux acteurs de l'immunité innée, nous avons effectué une recherche assidue qui tente d'éclaircir les molécules impliquées en fonction du type cellulaire, en insistant sur les PRRs de l'ADNdb (tableau 12).

### 6.1.3 Perspectives

Le sort de l'inflammation est intimement lié aux mécanismes moléculaires de l'immunité innée. Tel que vu au chapitre 1, la reconnaissance d'agents immunostimulants met en branle un programme de défense visant l'élimination d'une source quelconque pouvant agir à titre d'agent causal de l'inflammation. Les kinases IKK et IKK-related ont un rôle clé dans cette réponse, puisqu'elles sont directement responsables de l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF-3, respectivement, qui sont impliqués dans la transcription de cytokines pro-inflammatoires. Certains PRRs ont la capacité de reconnaître tout autant des motifs endogènes qu'exogènes. C'est le cas de certains TLRs (voir tableau 1), mais également des nouveaux senseurs de matériel génétique tels que l'ADNdb et l'ARN. Bien que la plupart des molécules impliquées dans l'immunité innée soient exprimées de manière constitutive, on reconnaît que certaines sont inductibles, telles que RIG-I [1430-1432], MDA-5 [1433], IFI16 [1434, 1435] et ZBP1 [1409], induites par les IFNs, tandis que d'autres telles que TRIF [169] seraient induites via NF- $\kappa$ B. L'expression des TLRs a été évaluée dans nombre de maladies inflammatoires (tableau 1), et ne pourrait être traitée ici en détail. Plusieurs données intéressantes existent quant à l'expression des PRRs dans l'AT. Nous sommes particulièrement intéressés à vérifier le profil des PRRs exprimés par les VSMC, en vue d'identifier la contribution du ou des senseurs du HCMV à l'inflammation. Mais cette étude déborde en fait du cadre strict de l'infection au HCMV. En effet, compte tenu que les mêmes PRRs semblent pouvoir être impliqués dans la

reconnaissance d'acides nucléiques exogènes et endogènes, notre étude pourra révéler l'importance pro-inflammatoire des débris nécrotiques au sein de la plaque athéromateuse, par exemple. Tel qu'il a été vu précédemment et illustré à la figure 40, l'ADNdb a la possibilité d'être reconnu par de multiples PRRs. Nous ne pouvons pas prédire le ou les PRRs du HCMV exprimés par la VSMC en se basant sur les études récentes; il existe une trop grande variabilité d'expression au sein des différents types cellulaires. Hormis l'expression des TLRs et des récepteurs *scavenger*, la littérature scientifique est très pauvre en ce qui concerne l'expression des PRRs dans les VSMC, et la même observation peut être faite quant au rôle des nouvelles molécules impliquées dans l'immunité innée telles que DDX3 et STING dans ce type cellulaire. Une seule piste s'offre présentement à nous : RIG-I. Il a été observé que RIG-I était exprimé dans les macrophages de l'intima de lésions athérosclérotiques [1436]. Bien que l'expression de RIG-I n'ait pas été évaluée dans ce contexte chez les VSMC, il est connu que son expression est inductible dans ce type cellulaire [1437], ainsi que dans les cellules endothéliales [1430, 1438, 1439]. Cela laisse à penser que la nouvelle voie de l'ARN pol III-RIG-I-VISA pourrait être impliquée dans l'immunité innée au HCMV dans les VSMC. Nous croyons donc qu'une étude qui réalise l'inventaire des PRRs (et autres molécules associées) exprimés par la VSMC est essentielle afin de mieux apprécier sa sensibilité aux différents agents immunostimulants, et de mieux la connaître en tant que cellule de première ligne de défense contre les infections ou la reconnaissance de DAMPs. L'étude du comportement des différents types de VSMC dans ce contexte serait également envisageable (section 2.3.3). En second lieu, l'étude des synergismes pro-inflammatoires est toujours pertinente dans un contexte d'inflammation chronique, et il sera profitable d'évaluer à cet effet l'influence de l'AngII, des IFNs et des marqueurs de l'inflammation tels que la CRP sur le caractère inductible de certains PRRs. Il a été montré récemment dans le journal *Life Science* que la CRP induisait l'expression de TLR4 et les processus immunitaires qui en découlent dans les VSMC de rat [1440]. Ce genre d'étude pave le chemin de la compréhension du rôle de la *low grade inflammation* dans l'établissement des maladies inflammatoires chroniques (section 1.5).

## **6.2 Discussion autour de l'article « The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the IkappaB kinase complex » (publié)**

### **6.2.1 Importance de l'étude et résultats connexes**

Tel qu'il a été vu à la section 2.4.1.3 de l'introduction, l'AngII est une hormone qui possède les traits d'un facteur de croissance ainsi que ceux d'une cytokine pro-inflammatoire. Bien que l'AngII plasmatique soit une cible pharmacologique toute indiquée dans le traitement de l'hypertension (bloqueurs AT1 ou inhibiteurs de ACE-1), nous avons bien illustré l'importance grandissante qu'accorde la recherche actuelle à l'existence d'un système rénine-angiotensine local (voir figure 16 et tableau 7). L'AngII devient donc un acteur important au sein de microenvironnements inflammatoires, et exercera ses effets sur les cellules qui expriment ses récepteurs. Nos études ont été réalisées avec des VSMC de rat, mais auraient tout aussi bien pu être réalisées dans un autre type cellulaire exprimant AT1 tel que le macrophage [909], dont le rôle dans l'AT est indiscutable (exemple à la section 2.2.2). Quel que soit le type cellulaire à l'étude, nos travaux de recherche s'intéressent avant tout à la caractérisation des voies pro-inflammatoires induites par le récepteur AT1. Puisque quelques études avaient déjà montré que l'AngII pouvait induire l'activation de NF- $\kappa$ B dans les VSMC, nous étions intrigués par le mécanisme menant à son activation dans ce type cellulaire. En effet, NF- $\kappa$ B était surtout connu à l'époque pour être induit dans des conditions inflammatoires sévères, tel que par des agents pathogènes ou des cytokines pro-inflammatoires (ex : le TNF- $\alpha$ ). Est-ce que l'AngII avait la capacité d'induire NF- $\kappa$ B avec le même niveau d'intensité que le TNF- $\alpha$  ? Est-ce que le mode d'activation de NF- $\kappa$ B par l'AngII était classique, exhibant une dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , ou bien s'agissait-il d'une voie alternative (figure 28) ? L'équipe d'Allen Brasier avait montré en 1999 dans *Circulation Research* que l'AngII induisait la translocation de p65/p50 dans



le noyau des VSMC de rats selon un mode biphasique où la première phase, rapide, dépendait de la protéolyse d'I $\kappa$ B $\alpha$ , et la deuxième, tardive et soutenue, de la maturation de p105 [948]. Dès nos premières observations du comportement d'I $\kappa$ B $\alpha$  suivant une stimulation à l'AngII dans les VSMC, nous n'observions pas de protéolyse d'I $\kappa$ B $\alpha$  ni de maturation de p105. Ces expériences se sont concrétisées entre autres par l'étude de la stabilité d'I $\kappa$ B $\alpha$  par *pulse chase* au S<sup>35</sup> (article #2 figure 3B). Il existe une certaine discordance entre les résultats présentés par différents laboratoires quant aux voies de signalisation induite par l'AngII, spécifiquement dans les VSMC. Nous voulons sensibiliser le lecteur au fait que les VSMC ont plus d'un phénotype (voir section 2.3.3), ce qui explique probablement cette variabilité. Bien que nos résultats aient été reproduits à l'aide de VSMC provenant d'espèces de rats différentes, nous croyons que toute étude qui utilise la VSMC, humaine ou d'autre nature, doit spécifier explicitement la technique qui a été utilisée pour son isolation (ex : digestion enzymatique, explantation), et bien sûr la fenêtre de passage des cellules en culture.

Notre étude montre clairement que l'AngII active rapidement le complexe IKK, toutefois à un niveau moindre que celui atteint par le TNF (article #2 figures 2 et S3). Alors qu'un virus tel que le SeV induit l'activation d'IKK $\beta$  après environ 2h d'infection (article #1 figure 3B), l'activation du complexe IKK par l'AngII est de l'ordre des minutes (voire même des secondes [1386]). Ceci suggère que l'activation d'IKK $\beta$  est réalisée à proximité du récepteur AT1, et nous discuterons des résultats qui ont concrétisé cette hypothèse à la prochaine section. Puisqu'I $\kappa$ B $\alpha$  n'est pas la cible d'IKK $\beta$  par phosphorylation suivant la stimulation d'AT1 (article #2 figure 3A), une alternative s'offrait à nous, soit l'activation directe de p65 par IKK $\beta$  (figure 26 et section 3.2.4). Nos résultats montrent que l'AngII induit effectivement la phosphorylation de p65 au niveau de la sérine 536 (article #2 figure 4B), et qu'une petite quantité de p65 phosphorylé est retrouvée au noyau des VSMC suivant la stimulation (article #2 figures 5D et S4). L'usage d'ARN interférence dirigé contre IKK $\beta$  montre finalement que cette kinase est responsable de cette phosphorylation (article #2 figure 5F).

Pendant que nous préparions le manuscrit de cette étude, une équipe nous devança quelque peu en montrant que l'AngII induisait l'activation du complexe IKK et de RSK dans les VSMC, et que ces 2 voies indépendantes étaient impliquées dans l'activation de p65 [1441]. Nous avons donc entrepris de vérifier l'implication de la voie MEK-ERK-RSK dans l'activation de p65 par l'AngII. L'usage des inhibiteurs de MEK PD 98059 et U0126 nous ont montré que cette voie n'était pas du tout impliquée dans l'activation de p65, et ce, en présence d'AngII pour des périodes allant de 5 minutes à 1h (article #2 figure 5A,B). Nous ne parvenons pas à expliquer cette différence notable, bien que l'explication du type de VSMC mentionnée antérieurement soit plausible. Ce résultat est tout de même important, puisque l'AngII est reconnue pour induire la transactivation de différents récepteurs à activité TK tel que l'EGFR (section 2.4.1.2). L'EGFR a le potentiel d'être responsable d'une partie des effets hypertrophiques et pro-inflammatoires de l'AngII, phénomènes où l'implication des voies MEK-ERK-RSK et PI3K/AKT est suspectée importante. Or, l'usage de l'inhibiteur de l'activité de l'EGFR, le AG-1478, ainsi que l'utilisation du LY294002, un inhibiteur de PI3K, ne diminuent pas la phosphorylation de p65 induite par l'AngII (article #2 figure 6). L'ensemble de ces résultats renforce donc l'idée que l'activation rapide du complexe IKK par AT1 est spatialement rapprochée.

Cette thèse a pour objectif de déterminer le rôle des kinases IKK et IKK-related dans l'inflammation. Nous avons entrepris de multiples expériences pour trouver de nouveaux rôles à ces kinases. Par exemple, nous avons montré que TBK1 et IKK-i n'étaient pas impliquées dans l'activation du *heat shock factor* 1 (HSF-1) durant un choc thermique, tel qu'observé par son induction, sa phosphorylation et sa capacité à lier l'ADN (Gravel SP & Servant MJ, résultats non publiés). Cependant, nos efforts se concentraient davantage à la caractérisation des mécanismes pro-inflammatoires dictant la synthèse de cytokines ou de molécules d'adhésion, et non ceux des points cardinaux proprement dits (*calor*, section 1.1). Ainsi, puisque l'AngII agit à la manière d'une cytokine pro-inflammatoire en induisant l'activation du complexe IKK, et sachant qu'une cytokine telle que le TNF peut activer TBK1 [130, 1075], nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'AngII pouvait également moduler l'activation de TBK1. Un nombre grandissant de molécules endogènes

activent TBK1, sans toutefois mener à l'activation d'IRF-3 (voir les substrats de TBK1 à la figure 24), parmi lesquels on retrouve l'IL-1 $\alpha$  [1075, 1442], le PDGF et le PMA [130]. Nous avons utilisé différentes approches pour vérifier l'activation et le rôle de TBK1 dans la signalisation induite par l'AngII (figure 39). Ces résultats, contre toute attente, montrent que TBK1 a un rôle inhibiteur de diverses voies modulées par l'AngII, autant au niveau de l'activation de NF- $\kappa$ B que d'AP-1. Environ 2 ans après l'obtention de nos résultats, l'équipe de Philip Cohen a montré que les kinases TBK1 et IKK-i exercent un effet inhibiteur au niveau du complexe IKK [1442]. Cet effet est apparent lorsque différents types cellulaires sont traités avec un inhibiteur des kinases IKK-related, puis stimulées avec l'IL-1 $\alpha$  ou le TNF- $\alpha$ . L'usage de l'inhibiteur des kinases IKK-related augmente significativement l'activation de la voie IKK-NF- $\kappa$ B par le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\alpha$ . Les auteurs n'ont pas étudié l'effet de l'inhibiteur sur la voie MEK-ERK, mais ont analysé l'état de phosphorylation des MAPK p38 et JNK. Les auteurs ne mentionnent pas ni n'expliquent leur résultat où l'on observe que l'inhibiteur entraîne une plus grande activation de ces MAPK par le TNF- $\alpha$  dans les MEFs. Nous pourrions donc croire que nos expériences d'ARN interférence dirigée contre les kinases IKK-related trouvent une certaine correspondance avec l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de ces kinases. Puisque l'inhibition de TBK1 ne module pas seulement le complexe IKK, mais également les MAPK, que ce soit lors d'un traitement à l'AngII ou au TNF- $\alpha$ , ceci suggère que TBK1 pourrait exercer ses effets inhibiteurs en amont de l'activation de ces voies de signalisation. Une cible intéressante serait la kinase TAK1 (voir figure 4), qui chapeaute justement toutes ces voies, ou l'une des nombreuses ubiquitine ligases retrouvées en amont. À cet effet, nous allons aborder dans la prochaine section quelques récents développements dans la caractérisation des voies menant à l'activation du complexe IKK par les GPCR.

En conclusion, notre étude expose un mécanisme atypique par lequel le complexe IKK est responsable des effets pro-inflammatoire d'une hormone circulante associée à l'hypertension et à l'athérosclérose. Notre étude suggère donc que le complexe IKK est une

cible importante pour le traitement des maladies inflammatoires du système cardiovasculaire. Nous discutons de cette éventualité à la section 6.4 en fin de discussion.

### 6.2.2 Récents développements et perspectives

Suivant la publication de notre étude, un article de grande importance publié dans *Genes and Development* en 2007, et sous la direction de Xin Lin, a donné suite à la caractérisation des voies menant à l'activation du complexe IKK par certains GPCR [1443]. Il s'est avéré que la signalisation des GPCR couplés à  $G\alpha_q$ , tels que ceux du LPA et de l'ET-1, partageait d'étonnantes similitudes avec celles des récepteurs TCR et BCR (voir figure 28). Ces récepteurs lymphocytaires signalisent via la molécule CARMA1 qui leur est pratiquement exclusive. Or, CARMA3 (CARD10/Bimp1) est un membre de la famille CARMA qui est exprimé dans de nombreux tissus, dont ceux sensibles à l'AngII [1444]. La déficience en CARMA3 bloque l'activation du complexe IKK par le LPA, ainsi que les phosphorylations inductibles de p65 et d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Cependant, cette déficience n'affecte pas la phosphorylation d'IKK $\beta$  au niveau des sérines activatrices Ser177 et 181. Les auteurs montrent que CARMA3 module plutôt l'ubiquitination d'une protéine associée à NEMO. À l'aide de cellules déficientes en TRAF6, les auteurs montrent que cette ubiquitine ligase est essentielle à l'activation de NF- $\kappa$ B par le LPA. Une étude publiée durant la même période a montré que l'AngII induisait dans les hépatocytes l'activation du complexe IKK via une voie CARMA3-Bcl10-MALT1 [1444]. À l'aide de ces informations importantes, notre laboratoire a investigué l'implication de ces différentes voies dans les VSMCs, ce qui a mené une collègue à publier d'impressionnants résultats dans le *Journal of Biological Chemistry* en 2010 [1386]. Il s'agit à ce jour de l'étude la plus complète sur les voies d'activation du complexe IKK dans les VSMC stimulées à l'AngII. À l'aide d'une approche ARN interférence et d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques, cette étude montre que l'activation du complexe IKK est biphasique, la première phase (15 secondes à 5 minutes) dépend d'une voie PKC $\alpha$ -(CARMA3-BCL10-MALT1)-TRAF6 et TAK1, et la

seconde (à partir de 5 minutes environ) requiert la voie MEK-ERK-RSK. Ces deux voies convergent de manière indépendante vers la phosphorylation activatrice d'IKK $\beta$ .

En dépit de la récente et éclairante caractérisation de ces voies, beaucoup de questions demeurent sans réponse. L'étude de l'ubiquitination est l'un des domaines les plus compétitifs et les plus surprenants de la recherche actuelle. De nouveaux modes d'ubiquitination sont caractérisés [1445], et la découverte récente du rôle des chaînes d'ubiquitine libres en tant que seconds messagers menant à l'activation de kinases [1251] ouvrent la voie à une appréciation plus juste de la signalisation cellulaire. Ainsi, quelle est la contribution des procédés d'ubiquitination dans l'activation du complexe IKK par l'AngII ? Est-ce que l'activité ubiquitine ligase de TRAF6 est importante ? Est-ce que d'autres ubiquitine ligases sont impliquées dans l'ubiquitination de NEMO ou TAK1 via les GPCR ? Et qu'en est-il de  $\beta$ -arrestine, reconnue depuis quelques années pour mener à l'inhibition de NF- $\kappa$ B par séquestration de son inhibiteur [950, 1382] ?  $\beta$ -arrestine interagit également avec TRAF6 et mène à l'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B par l'IL-1 $\beta$  et le poly(I:C) [1446]. Or, il a été montré que le récepteur du LPA active le complexe IKK via  $\beta$ -arrestine 2 [941], ce qui laisse croire que  $\beta$ -arrestine 2 a la capacité de recruter le complexe CARMA3-Bcl10-MALT, et peut-être également d'autres molécules d'échafaudage impliquées dans l'activation du complexe IKK et des MAPK. Comment réconcilier tant de résultats qui semblent opposés ? Nous croyons que ces différences expérimentales sont principalement attribuables aux modèles cellulaires étudiés, aux différents GPCR à l'étude, ainsi qu'aux effets non-physiologiques de surexpression de protéines dans des systèmes hétérologues. Il n'en demeure pas moins important de bien caractériser les voies menant à l'activation du complexe IKK par l'AngII. Notons que ces nouveaux procédés d'ubiquitination et les nouvelles molécules d'échafaudage impliquées dans la signalisation d'AT1 ne sont pas exclusifs à ce récepteur. Ainsi, la détermination de nouvelles cibles pharmacologiques pour le traitement de l'hypertension et de l'inflammation chronique se doit d'être bien documentée.

### **6.3 Discussion autours de l'article « TANK-Binding Kinase-1 is an essential modulator of HIF-1 $\alpha$ translational induction during hypoxic stress » (manuscrit)**

Dans cette dernière étude, nous abordons un nouvel aspect des kinases IKK-related qui déborde du cadre strict de l'immunité innée. Tel qu'il a été vu à la section 3.4, de récentes évidences lient ces kinases à la transformation oncogénique. Ces kinases favorisent la survie et sont, sous certaines conditions, anti-apoptotiques. Le cancer et l'inflammation sont intimement reliés, les 2 processus se nourrissant mutuellement, entre autres par l'induction de facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B et STAT3 (section 1.6). HIF-1, maître de la réponse hypoxique, a également été associé aux conditions inflammatoires chroniques ainsi qu'au développement du cancer. HIF-1 a la capacité d'induire des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, mais prend également part à la survie cellulaire et à la réponse immunitaire (section 1.6.1). Il appert que les kinases IKK et IKK-related partagent un rôle influent au niveau de la réponse hypoxique, bien que leurs mécanismes d'action ne présentent pas de similitude *a priori* (section 3.4). Justement, alors que les kinases canoniques IKK $\alpha/\beta$  modulent l'induction transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  en conditions normoxiques et/ou hypoxiques, nous montrons que la kinase TBK1 module la traduction de ce dernier par un mécanisme qui implique en partie la modulation de la voie MEK-ERK-RSK (article #3 figure 6). Selon nos résultats, IKK-i ne semble pas partager ce rôle avec TBK1 (article #3 figures 1D-E, 2C-D, 5A-B, 5D). D'ailleurs, l'expression de cette dernière est très faible, voire non détectable par immunobuvardage d'extraits cellulaires totaux, dans plusieurs types cellulaires étudiés. Cependant, il est connu qu'IKK-i peut être inductible, et nous la retrouvons particulièrement exprimée dans des cellules myéloïdes telles que les U937 (article #1 figure 6A). En dépit de la plus forte expression de plasmides encodant pour Myc/Flag-IKK-i en comparaison de Myc/Flag-TBK1, et ce, dans tous les types cellulaires étudiés, IKK-i n'a visiblement pas d'effet sur l'induction de HIF-1 $\alpha$ , que ce soit en condition de stress hypoxique ou par sa simple surexpression. À cet effet, l'étude des

sites de phosphorylation ciblés par TBK1 et IKK- $\gamma$  suggère quelques subtiles différences. Nous présentons à la figure 41 les motifs consensus ou optimaux de phosphorylation de ces kinases, ainsi que le contexte biochimique au sein duquel les phosphorylations ont lieu chez certains substrats reconnus. L'étude de phosphorylation de peptides *in vitro* n'est certes pas représentative de la phosphorylation *in vivo* d'une protéine qui adopte une structure tridimensionnelle. De manière intéressante, nous avons déjà décelé de nombreux motifs consensus pour les kinases IKK-related au sein de la protéine HIF-1 $\alpha$ . De plus, une version recombinante de TBK1 a la capacité d'induire de manière suprenante la phosphorylation d'un HIF-1 $\alpha$  recombinant *in vitro*, tel que détecté par incorporation du phosphate 32 et par un retard sur gel SDS-PAGE évident de HIF-1 $\alpha$  (Gravel SP & Servant MJ, résultats non publiés.). Nous ne savons pas actuellement si TBK1 peut phosphoryler HIF-1 $\alpha$  *in vivo*, ainsi que le rôle de cette modification post-traductionnelle. Nous savons cependant que cette kinase n'augmente pas la stabilité de HIF-1 $\alpha$  (article #3 figures 3 et 5C), et que d'autres kinases ont la capacité de phosphoryler HIF-1 $\alpha$  (légende de la figure 10).

L'un des aspects importants de notre étude est que les agents mimétiques de l'hypoxie, le CoCl<sub>2</sub> et le DFX, ainsi que l'hypoxie entraînent une augmentation rapide et soutenue de l'expression de TBK1 (article #3 figure S4 ; voir également la discussion de l'article #3 au sujet de la régulation de TBK1). Il semble que l'expression de TBK1 soit sensible aux conditions de culture cellulaire : la déprivation de sérum entraîne une diminution de son expression. Quoiqu'il en soit, TBK1 module l'expression de HIF-1 $\alpha$  en présence ou en absence de sérum. Il est toutefois possible que le rôle traductionnel de TBK1 soit proportionnel à son niveau d'expression. L'induction de TBK1 par l'hypoxie va de pair avec son « autophosphorylation » à la sérine 172, résidu de la boucle d'activation (article # 3 figure S4C, figures 22 et 41). Le rôle de TBK1 pourrait donc être influencé par la stoechiométrie de son expression au sein d'un complexe traductionnel, ce qui n'a pas été évalué par la présente étude. Nous abordons actuellement l'étude des molécules associées à TBK1 en conditions normoxiques et hypoxiques et qui pourraient expliquer ses effets traductionnels (ex : DDX3, section 6.1.2).

P

TBK1 consensus		V		N		G			S	L		D/E		E/L			E
IKK-i optimal							Y F/P M		S	L I M/F		Y W/F					
		-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+5	+5	+6	+7	+8
IRF-3	S396	V	D	L	H	I	S	N	S	H	P	L	S	L	T	S	D
	S402	I	S	N	S	H	P	L	S	L	T	S	D	Q	Y	K	A
CYLD (S418)		T	T	E	N	R	F	H	S	L	P	F	S	L	T	K	M
DDX3X	S429	V	E	E	S	D	K	R	S	F	L	L	D	L	L	N	A
	S442	L	N	A	T	G	K	D	S	L	T	L	V	F	V	E	T
TBK1 (S172)		E	D	D	E	Q	F	V	S	L	Y	G	T	E	E	Y	L
IKK-i (S172)		D	D	D	E	K	F	V	S	V	Y	G	T	E	E	Y	L
TSC1 ?		D	S	P	F	Y	R	D	S	L	P	G	S	Q	R	K	T

Non polaire

Polaire non chargé

Polaire chargé +

Polaire chargé -

Gravel SP © 2010

**Figure 41: Étude des sites de phosphorylation connus des kinases IKK-related.**

Le site consensus de TBK1 a été évalué à partir de plusieurs peptides provenant de substrats connus et phosphorylés in vitro [1128]. Le site optimal de phosphorylation de IKK-i a été évalué par l'étude de combinaisons multiples d'acides aminés au sein de la séquence phosphoacceptrice [1136]. Le site phosphoaccepteur, le plus souvent une sérine, est placée à la position 0. Les résidus favorisant la phosphorylation de la sérine ont été placés en ordre d'importance de bas en haut (par exemple, la leucine en position +1 est plus importante que la phénylalanine). Nous avons aligné les séquences contenant des sites phosphoaccepteurs connus dans la grille inférieure. Nous avons identifié par un code de couleurs les propriétés biochimiques des résidus retrouvés de part et d'autre du site phosphoaccepteur. Cette analyse nous montre qu'il y a certes un contexte polaire et/ou chargé autour de la sérine phosphoacceptrice, cependant la nature de ce contexte ne semble pas être conservée, ni ne pourrait actuellement faire office de consensus. L'accessibilité du site phosphoaccepteur au sein de la protéine repliée demeure, selon nous, le seul facteur réellement déterminant qui dicte la phosphorylation par les kinases IKK-related in vivo. Voir le texte au sujet de TSC1.

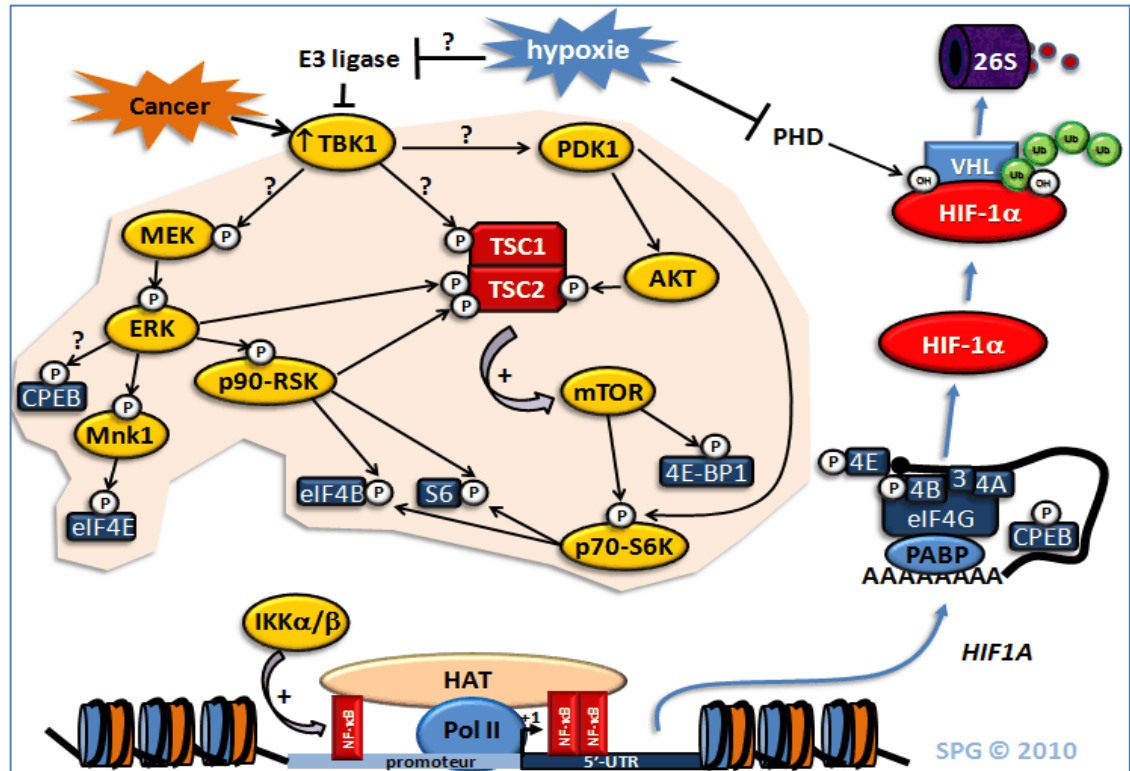


L'approche ARN interférence dirigée contre TBK1 a été utilisée dans l'article #1, et nous avons illustré les résultats d'une telle approche lorsqu'appliquée à l'étude des effets pro-inflammatoires et hypertrophiques de l'AngII (figure 38). Puisque l'induction de HIF-1 $\alpha$  lors d'un stress hypoxique est dépendante de l'expression de TBK1, nous avons testé l'approche ARN interférence pour confirmer cette observation. Or, l'ARN interférence de TBK1 a eu un effet inverse à celui attendu. Il apparaît que l'ARNi dirigé contre TBK1 induise le taux basal de *HIF1A* (figure 39B), ce qui est probablement responsable d'une traduction plus efficace (figure 39C). Nous ne savons pas actuellement si la réponse ARN interférence modifie l'activité de TBK1 ou module l'activation du complexe IKK. Tel que mentionné à la section 6.1.2, le traitement ARNi dirigé contre TBK1 pourrait avoir l'effet d'un inhibiteur pharmacologique de TBK1. Puisque TBK1 a la capacité d'inhiber le complexe IKK sous certaines conditions [1442], nous pouvons imaginer que la voie IKK-NF- $\kappa$ B est davantage activée en présence du siARN dirigé contre TBK1. Ainsi, l'approche ARN interférence semble modifier la réponse transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  et comprend donc trop d'incertitudes pour être utilisée dans ce contexte. Nous croyons que l'approche présentée dans l'article #3, qui utilise des cellules complètement déficientes en TBK1, telles que les MEFs TBK1/IKK-i DKO, ainsi que notre modèle de cellules DKO exprimant Flag-TBK1 de manière stable, sont des modèles mieux indiqués pour étudier le rôle de la traduction *Ceteris paribus*.

Nous montrons également que la surexpression de TBK1 dans les HEK 293T induit la phosphorylation de nombreuses protéines reconnues pour être impliquées dans la traduction. TBK1 induit la phosphorylation de ERK, RSK, Akt et TSC1 (article # 3 figures 6A-B et S3). L'usage d'inhibiteurs de MEK et de RSK diminue l'induction de HIF-1 $\alpha$  par le stress hypoxique, alors que le LY294002, un inhibiteur de PI3K, ne modifie pas l'induction de HIF-1 $\alpha$ , malgré l'inhibition complète de la phosphorylation d'Akt (article #3 figure 6C). Nous soupçonnons donc que TBK1 module en partie la traduction de HIF-1 $\alpha$  via la voie MEK-ERK-RSK, puisque l'induction de la phosphorylation de ERK et de RSK par le stress hypoxique est fortement diminuée en absence de TBK1 (article #3 figure 6F).

TBK1 pourrait également moduler la voie mTOR. Dans la signalisation induite par le TNF, IKK $\beta$  a été impliquée dans la phosphorylation de TSC1 au niveau des sérines 487 et 511, ce qui mène à la dégradation de TSC1 et l'activation de mTOR [1377]. La sérine 511 nous a semblé particulièrement intéressante, puisqu'elle présente un contexte biochimique propice à la phosphorylation directe par TBK1 (voir figure 41). Cependant, nous ne parvenons pas à observer une phosphorylation de TSC1 durant le stress hypoxique (article #3 figure S4A-B). De plus, des données préliminaires nous montrent que le substrat de mTOR, 4E-BP1, est fortement phosphorylé sous conditions normoxiques en absence de TBK1 (Gravel SP & Servant MJ, résultats non publiés). Le rôle de modulateur traductionnel de TBK1 ne semble donc pas lié à l'activation de mTOR en condition hypoxique. Cependant, nous ne pouvons pas exclure le rôle de TBK1 dans la modulation de la voie TSC-mTOR en conditions d'infection avec des pathogènes bactériens ou viraux. La voie TSC-mTOR est impliquée dans l'induction de cytokines pro-inflammatoires, des IFNs de type I, de différents ISGs et d'IRF-7 en condition infectieuse [1447-1450]. TBK1 pourrait donc être importante dans la régulation de transcrits spécifiques en condition infectieuse, ce qui représenterait un nouveau rôle pour cette kinase impliquée dans l'activation de IRF-3/-7. En résumé, nous avons illustré à la figure 42 les différentes voies que pourrait moduler TBK1 en condition hypoxique et qui sont présentement investiguées en vue d'une meilleure compréhension du rôle de TBK1 dans la traduction.

En conclusion, notre étude est la première à présenter avec originalité un rôle traductionnel de TBK1, et ce nouvel aspect de régulation renforce l'implication des kinases IKK-related dans les processus inflammatoires, que ce soit au niveau de l'angiogenèse, l'inflammation proprement dite ou le cancer. Notre étude pave le chemin à différentes études passionnantes. En effet, hormis *HIF1A*, quels gènes sont modulés par TBK1 ? Est-ce que TBK1 peut moduler préférentiellement les traductions CAP-indépendantes, et si oui, par quels moyens ? Cet effet sur la traduction a-t-il des retombées sur le cycle cellulaire, la prolifération et le développement ? TBK1 nous apparaît donc comme une cible importante dans le traitement des maladies inflammatoires, et l'étude de sa régulation est de ses rôles demeure une nécessité.



**Figure 42 : Ensemble des rôles potentiels de TBK1 dans la régulation traductionnelle de HIF-1alpha.**

Le rôle traductionnel de TBK1 semble être lié à son expression (article #3 figure S4), puisque son ARNm est induit en condition hypoxique et retrouvé à la hausse dans les tumeurs solides [1373]. Nous avons montré que la surexpression de TBK1 pouvait induire la phosphorylation de ERK, RSK, Akt et TSC1. TSC2 peut également être la cible de ERK [1451], RSK [1452] et Akt [1453]. ERK peut moduler eIF4E via l'activation de Mnk1 [1454]. Par ailleurs, plusieurs RBPs sont connues pour lier *HIF1A*. Est-ce que les voies activées par TBK1 peuvent moduler les RBPs ? CPEB peut être phosphorylé directement par des kinases telles que CaMKII [1455] et Aurora A [1456]. Une évidence suggère également que ERK peut phosphoryler CPEB [1457]. Nous avons d'ailleurs retrouvé des éléments CPE au sein de l'ORF de *HIF1A* (voir figure 13), ce qui irait de pair avec notre résultat qui montre que TBK1 peut induire une version de HIF-1α dépourvue de son extrémité 3'-UTR (article # 3 figure S2). Nous croyons que les kinases IKK ne sont pas impliquées dans l'induction transcriptionnelle de HIF-α en hypoxie, mais sont responsables du taux d'ARNm disponibles. Ainsi, plus la quantité d'ARNm *HIF1A* est grande, plus la traduction sera importante, et plus les effets sur la stabilisation de HIF-1α deviendront apparents. Les kinases IKK et TBK1 agissent donc en collaboration dans l'induction de HIF-1α en condition de stress hypoxique.

## **6.4 Ouverture : les kinases IKK et IKK-related sont-elles des cibles pharmacologiques potentielles pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques ?**

Puisque les kinases IKK et IKK-related ont la capacité de mener à la transcription de gènes pro-inflammatoires dont ceux de cytokines, il semble intuitif d'affirmer que ces kinases peuvent être les cibles d'interventions pharmacologiques inhibitrices anti-inflammatoires. Cependant, de récentes études nous confrontent à des faits inattendus : l'inhibition de ces kinases a le plus souvent l'effet inverse de celui escompté.

L'équipe de Michael Karin a montré que la délétion conditionnelle d'IKK $\beta$  dans les cellules myéloïdes augmentait drastiquement la sensibilité aux endotoxines et la mortalité chez la souris [1458]. Cette étude montre également que l'inhibition prolongée d'IKK $\beta$  à l'aide d'un inhibiteur spécifique, le MLN120B [1459], a des effets similaires. Ces effets inattendus révèlent qu'IKK $\beta$  régule négativement la maturation d'IL-1 $\beta$  (section 1.3.2.4). D'autres mécanismes pourraient expliquer ces observations, telles que les effets anti-apoptotiques de NF- $\kappa$ B, son rôle dans l'induction de régulateurs négatifs de diverses voies inflammatoires (par exemple A20 [1460]), et bien sûr, son rôle essentiel dans la réponse immunitaire, dont l'effet est de limiter la susceptibilité aux infections. Ainsi, la voie IKK $\beta$ -NF- $\kappa$ B a deux visages. D'une part son activation peut mener à une inflammation systémique, et d'autre part elle est fondamentalement protectrice [1461]. Notons toutefois que l'inhibition spécifique d'IKK $\beta$  a montré des résultats prometteurs dans nombre d'études expérimentales. Par exemple, un modèle d'asthme chez la souris montre que l'inhibiteur IMD-0354 diminue l'inflammation et le remodelage des voies respiratoires [1462]. Une étude encourageante a montré récemment que l'inhibition partielle et transitoire d'IKK $\beta$  à l'aide du BMS-066 dans différents modèles animaux diminuait significativement l'arthrite [1463]. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs d'IKK $\beta$  n'est peut-être pas sans risque chez l'humain, mais l'étude plus approfondie de leur pharmacocinétique permettra peut-être de reconsidérer leur utilité dans le traitement de maladies chroniques. À

cet effet, il est intéressant de constater qu'une étude récente montre que la prise journalière de faibles doses d'aspirine<sup>49</sup> diminue à long terme la mortalité liée à certains types de cancers [1466]. Ceci nous porte à réfléchir sur les rôles pléiotropiques de certains agents pharmacologiques, et au temps que peut prendre la recherche pour les découvrir suivant leur synthèse initiale. Enfin, mentionnons que l'inhibition pharmacologique d'IKK $\alpha$ , l'homologue le plus proche d'IKK $\beta$ , n'est toujours pas considérée intéressante, puisque cette kinase a des rôles anti-inflammatoires importants [1108, 1123, 1467, 1468].

Alors qu'il existe une littérature abondante sur l'utilisation d'inhibiteurs d'IKK $\beta$  (par exemple, la compagnie EMD vend 13 inhibiteurs distincts), il en va tout autrement pour les kinases IKK-related. Il a été montré qu'un composé initialement caractérisé pour être un inhibiteur de PDK1, le BX795 [1469], était en réalité davantage spécifique pour TBK1 (IC<sub>50</sub> de 2,3 nM pour TBK1 et 9,5nM pour IKK-i) [1075, 1470]. L'équipe du Dr Philippe Cohen est l'une des seules à utiliser des inhibiteurs des IKK-related kinases, ce qui lui a permis de faire quelques découvertes éclairantes quant à la régulation et au rôle de ces kinases. D'abord, leur étude a suggéré que la sérine 172, présente au sein du site actif (figures 22 et 41), pouvait être ciblée par une kinase inconnue [1075]. Également, l'utilisation d'un autre inhibiteur des kinases IKK-related, le MRT67307, a révélé que ces kinases pouvaient exercer une action inhibitrice sur l'activation du complexe IKK par différents stimuli (poly(I:C), IL-1) [1442]. Il n'existe pas dans la littérature d'autres inhibiteurs de ces kinases. Des composés anticancéreux et anti-angiogéniques tels que le SU6668, qui a pour cible l'activité TK des récepteurs du PDGF et du VEGF, inhibe TBK1 dans l'ordre du micromolaire, ainsi que plusieurs autres cibles [1374]. Par ailleurs, une toute autre molécule, le DMXAA, a été identifiée comme un agent de chimiothérapie potentiel et semble activer spécifiquement TBK1 [1471]. Ceci nous rappelle que les IFNs de type I sont des molécules anticancéreuses importantes. Ainsi, l'inhibition pharmacologique des kinases IKK-related a peut-être des effets tout aussi inattendus que

---

<sup>49</sup> Le lecteur sera peut-être surpris d'apprendre que l'aspirine inhibe le complexe IKK [1464]. Une étude plus récente montre que de faibles doses d'aspirine diminuent l'activation de NF- $\kappa$ B et l'induction de gènes associés dans les rats âgés [1465].

ceux de l'inhibition d'IKK $\beta$ . En se basant sur la récente étude de Philippe Cohen [1442], l'inhibition *in vivo* des kinases IKK-related entraînerait une plus forte activation de la voie NF- $\kappa$ B par des cytokines et des PAMPs, ce qui contribuerait peut-être à exacerber l'inflammation systémique. Par ailleurs, l'inhibition de la synthèse d'IFNs de type I pourrait entraîner une sensibilité accrue aux infections [1316, 1472]. Étant donné l'inexistence d'information concernant l'usage d'inhibiteurs des kinases IKK-related *in vivo*, pouvons-nous prédire leurs effets en se basant sur des modèles animaux déficients pour ces kinases ?

La délétion de TBK1 (T2K) dans les souris entraîne la mort embryonnaire au jour 14,5 suivant une dégénération massive du foie due à l'apoptose [129]. Étonnamment, cette étude montre qu'en dépit d'une activation normale de la voie NF- $\kappa$ B dans les MEFs T2K KO suite à une stimulation au TNF ou à l'IL-1, l'activité de NF- $\kappa$ B, de même que l'induction de transcrits NF- $\kappa$ B-dépendants, sont sévèrement inhibées. Quel que soit le mécanisme par lequel TBK1 module la voie NF- $\kappa$ B (section 3.3.2), ces résultats ne vont pas dans le sens de l'inhibition pharmacologique des kinases IKK-related présentée par Philippe Cohen [1442]. Les 2 études ont toutefois utilisé des MEFs, ce qui montre que l'effet différentiel ne peut être attribuable au type cellulaire, mais suggère plutôt que l'approche pharmacologique n'équivaut pas celle de l'absence complète des kinases. Une kinase peut avoir un rôle activateur ou de molécule d'échafaudage, par exemple, sans avoir recourt à son activité catalytique (ce qui a récemment été montré pour GSK3 $\beta$  [1473]). Également, l'inhibition partielle de kinases pourrait avoir des rôles compensatoires insoupçonnés. Une étude a cependant investigué le rôle de TBK1 dans un nouveau modèle de souris homozygotes pour une version tronquée et inactive de TBK1 nommées TBK1( $\Delta/\Delta$ ). Ces souris présentent plusieurs caractéristiques inflammatoires de l'épiderme, un excès de monocytes circulants et répondent de manière exagérée au stress endotoxique en produisant massivement des cytokines telles que TNF- $\alpha$  et IL-6 [1474]. Ce modèle semble aller de pair avec l'intervention pharmacologique mentionnée précédemment, et

laisse croire que TBK1 n'est pas une cible intéressante pour un traitement à long terme, notamment à cause de ses effets non-désirés sur l'inflammation systémique.

Nous pouvons donc difficilement conclure quant aux bénéfices d'une intervention pharmacologique des kinases IKK et IKK-related dans les maladies inflammatoires chroniques, et ne pouvons que souhaiter un approfondissement de la connaissance des effets de leur inhibition *in vivo*. La combinaison d'inhibiteurs de ces kinases à d'autres thérapies, telles que les anticorps anti-IL-1 et anti-TNF (arthrite rhumatoïde [1475, 1476]), serait envisageable, et probablement une avenue de recherche clinique future. Quoiqu'il en soit, les résultats de nos études présentées dans cette thèse montrent que ces kinases sont impliquées dans l'activation de facteurs de transcription qui dirigent la réponse inflammatoire. Également, nous présentons un nouveau rôle traductionnel de TBK1, ce qui ouvre la voie à une meilleure caractérisation de la régulation et du rôle de cette kinase. En connaissant les acteurs en amont de l'activation de ces kinases ainsi que leur expression au sein du tissu inflammatoire, il sera sans doute possible d'identifier des cibles pharmacologiques mieux indiquées pour le traitement de l'inflammation. Ces kinases n'étant pas les simples maillons d'une voie de signalisation pro-inflammatoire, mais bien des kinases impliquées dans des processus variés incluant la survie cellulaire, il nous apparaît essentiel de se rapprocher le plus possible de l'agent causal pro-inflammatoire, en ciblant par exemple les récepteurs et les PRRs à l'origine de leur activation.

## 7. Conclusion

Les résultats présentés dans cette thèse illustrent les différents mécanismes par lesquels les kinases IKK et IKK-related exercent leurs actions pro-inflammatoires. Nous avons utilisé comme modèle d'étude principal la VSMC, puisque cette cellule exhibe un phénotype grandement modifiable en condition inflammatoire, et les conclusions tirées de ce modèle peuvent mener à des pistes importantes pour parfaire la compréhension de la biopathologie des maladies inflammatoires chroniques telles que l'athérosclérose. Lors d'une infection virale par le HCMV, les kinases IKK-related TBK1 et IKK-i modulent l'induction des cytokines pro-inflammatoires RANTES et IP-10 via l'activation du facteur de transcription IRF-3. La kinase IKK $\beta$ , quant à elle, est impliquée dans l'activation de NF- $\kappa$ B et à l'induction des cytokines IL-6 et de MCP-1 par un agoniste de GPCR, l'AngII. Ce mécanisme d'activation est atypique et cible la phosphorylation directe de p65/RelA au niveau de la sérine 536. La recherche actuelle tente d'identifier de nouveaux substrats et de nouveaux rôles aux kinases IKK et IKK-related. Nous montrons que la kinase TBK1 est induite spécifiquement lors du stress hypoxique, et qu'elle module l'expression du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  par un nouveau mécanisme d'induction traductionnelle. Nos résultats suggèrent que TBK1 exerce ses actions sur de nouveaux substrats liés aux voies TSC-mTOR et MEK-ERK-RSK. Les kinases IKK et IKK-related ont des rôles qui semblent déborder du cadre strict de l'immunité innée. Nous croyons qu'une caractérisation approfondie du rôle de ces différentes kinases, ainsi que des voies menant à leur activation, sont nécessaires avant de les établir comme des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques.



## Bibliographie

1. Libby, P., *Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease*. Nutr Rev, 2007. **65**(12 Pt 2): p. S140-6.
2. Larsen, G.L. and P.M. Henson, *Mediators of inflammation*. Annu Rev Immunol, 1983. **1**: p. 335-59.
3. Weis, S.M., *Vascular permeability in cardiovascular disease and cancer*. Curr Opin Hematol, 2008. **15**(3): p. 243-9.
4. Rittner, H.L., A. Brack, and C. Stein, *Pain and the immune system*. Br J Anaesth, 2008. **101**(1): p. 40-4.
5. Huang, Y.H., A. Haegerstrand, and J. Frostegard, *Effects of in vitro hyperthermia on proliferative responses and lymphocyte activity*. Clin Exp Immunol, 1996. **103**(1): p. 61-6.
6. Cotran, R.S., et al., *Robbins pathologic basis of disease*. 6th ed. 1999, Philadelphia ; Montreal: Saunders. xv, 1425.
7. Kushner, I., D. Samols, and M. Magrey, *A unifying biologic explanation for "high-sensitivity" C-reactive protein and "low-grade" inflammation*. Arthritis Care Res (Hoboken). **62**(4): p. 442-6.
8. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
9. Janeway, C., *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 5th ed. 2001, New York: Garland Pub. xviii, 732.
10. Gillitzer, R. and M. Goebeler, *Chemokines in cutaneous wound healing*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(4): p. 513-21.
11. Ramaiah, S.K. and H. Jaeschke, *Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(6): p. 757-66.
12. Ramachandran, A., M. Madesh, and K.A. Balasubramanian, *Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions*. J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15**(2): p. 109-20.

13. Bhatia, M., *Inflammatory response on the pancreatic acinar cell injury*. Scand J Surg, 2005. **94**(2): p. 97-102.
14. Morganti-Kossmann, M.C., et al., *Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword*. Curr Opin Crit Care, 2002. **8**(2): p. 101-5.
15. Clydesdale, G.J., G.W. Dandie, and H.K. Muller, *Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects*. Immunol Cell Biol, 2001. **79**(6): p. 547-68.
16. Castano, A.P., P. Mroz, and M.R. Hamblin, *Photodynamic therapy and anti-tumour immunity*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(7): p. 535-45.
17. Gauglitz, G.G., et al., *Characterization of the inflammatory response during acute and post-acute phases after severe burn*. Shock, 2008. **30**(5): p. 503-7.
18. Zhao, Z., et al., *Oral exposure to cadmium chloride triggers an acute inflammatory response in the intestines of mice, initiated by the over-expression of tissue macrophage inflammatory protein-2 mRNA*. Toxicol Lett, 2006. **164**(2): p. 144-54.
19. Martinon, F., *Mechanisms of uric acid crystal-mediated autoinflammation*. Immunol Rev, 2010. **233**(1): p. 218-32.
20. Kahl, M., et al., *Efficient lytic infection of human arterial endothelial cells by human cytomegalovirus strains*. J Virol, 2000. **74**(16): p. 7628-35.
21. Britt, W., *Manifestations of human cytomegalovirus infection: proposed mechanisms of acute and chronic disease*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 417-70.
22. Ho, D.D., et al., *Replication of human cytomegalovirus in endothelial cells*. J Infect Dis, 1984. **150**(6): p. 956-7.
23. Hajjar, D.P., et al., *Herpes simplex virus infection in human arterial cells. Implications in arteriosclerosis*. J Clin Invest, 1987. **80**(5): p. 1317-21.
24. Kaukoranta-Tolvanen, S.S., et al., *Chlamydia pneumoniae multiplies in human endothelial cells in vitro*. Microb Pathog, 1994. **16**(4): p. 313-9.
25. Gaydos, C.A., et al., *Replication of Chlamydia pneumoniae in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells*. Infect Immun, 1996. **64**(5): p. 1614-20.

26. Kol, A. and P. Libby, *The mechanisms by which infectious agents may contribute to atherosclerosis and its clinical manifestations*. Trends Cardiovasc Med, 1998. **8**(5): p. 191-9.
27. Wang, C.Y. and B. Sugden, *New viruses shake old paradigms*. J Clin Invest, 2004. **113**(1): p. 21-3.
28. Kepp, O., et al., *Pyroptosis - a cell death modality of its kind?* Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 627-30.
29. Zitvogel, L., O. Kepp, and G. Kroemer, *Decoding cell death signals in inflammation and immunity*. Cell, 2010. **140**(6): p. 798-804.
30. Torchinsky, M.B., J. Garaude, and J.M. Blander, *Infection and apoptosis as a combined inflammatory trigger*. Curr Opin Immunol. **22**(1): p. 55-62.
31. Huynh, M.L., V.A. Fadok, and P.M. Henson, *Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation*. J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 41-50.
32. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. Cell, 2010. **140**(6): p. 821-32.
33. Thorp, E.B., *Mechanisms of failed apoptotic cell clearance by phagocyte subsets in cardiovascular disease*. Apoptosis, 2010. **15**(9):1124-36.
34. Schulze, C., et al., *Clearance deficiency--a potential link between infections and autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2008. **8**(1): p. 5-8.
35. Silva, M.T., A. do Vale, and N.M. dos Santos, *Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications*. Apoptosis, 2008. **13**(4): p. 463-82.
36. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
37. Patil, C. and P. Walter, *Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(3): p. 349-55.
38. Zhang, C., et al., *Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35867-74.
39. Ji, C. and N. Kaplowitz, *ER stress: can the liver cope?* J Hepatol, 2006. **45**(2): p. 321-33.

40. Sundar Rajan, S., et al., *Endoplasmic reticulum (ER) stress & diabetes*. Indian J Med Res, 2007. **125**(3): p. 411-24.
41. Feng, B., et al., *The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(9): p. 781-92.
42. Poyton, R.O., K.A. Ball, and P.R. Castello, *Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(7): p. 332-40.
43. Napoli, C., F. de Nigris, and W. Palinski, *Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall*. J Cell Biochem, 2001. **82**(4): p. 674-82.
44. Chou, M.Y., et al., *Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity*. J Intern Med, 2008. **263**(5): p. 479-88.
45. Christmann, M., et al., *Mechanisms of human DNA repair: an update*. Toxicology, 2003. **193**(1-2): p. 3-34.
46. Wang, Y., *Bulky DNA lesions induced by reactive oxygen species*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(2): p. 276-81.
47. Proskuryakov, S.Y. and V.L. Gabai, *Mechanisms of tumor cell necrosis*. Curr Pharm Des, 2010. **16**(1): p. 56-68.
48. Zhang, Q., et al., *Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 104-7.
49. Saitoh, T. and S. Akira, *Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins*. J Cell Biol, 2010. **189**(6): p. 925-35.
50. Bortoluci, K.R. and R. Medzhitov, *Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(10): p. 1643-51.
51. De Meyer, G.R. and W. Martinet, *Autophagy in the cardiovascular system*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(9): p. 1485-95.
52. Tsan, M.F. and G. Baochong, *Pathogen-associated molecular pattern contamination as putative endogenous ligands of Toll-like receptors*. J Endotoxin Res, 2007. **13**(1): p. 6-14.
53. Hornung, V., et al., *Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization*. Nat Immunol, 2008. **9**(8): p. 847-56.

54. Shi, Y., *Caught red-handed: uric acid is an agent of inflammation*. J Clin Invest, 2010. **120**(6): p. 1809-11.
55. Henderson, B., et al., *Caught with their PAMPs down? The extracellular signalling actions of molecular chaperones are not due to microbial contaminants*. Cell Stress Chaperones, 2010. **15**(2): p. 123-41.
56. Magalhaes, P.O., et al., *Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review*. J Pharm Pharm Sci, 2007. **10**(3): p. 388-404.
57. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
58. Rock, K.L. and H. Kono, *The inflammatory response to cell death*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 99-126.
59. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp, *The inflammasomes: guardians of the body*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 229-65.
60. Geijtenbeek, T.B. and S.I. Gringhuis, *Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 465-79.
61. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
62. Wills-Karp, M., et al., *New insights into innate immune mechanisms underlying allergenicity*. Mucosal Immunol, 2010. **3**(2): p. 104-10.
63. Chen, F. and X. Shi, *NF-kappaB, a pivotal transcription factor in silica-induced diseases*. Mol Cell Biochem, 2002. **234-235**(1-2): p. 169-76.
64. Shukla, A., M. Ramos-Nino, and B. Mossman, *Cell signaling and transcription factor activation by asbestos in lung injury and disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(8): p. 1198-209.
65. Henderson, B. and M. Wilson, *Modulins: a new class of cytokine-inducing, pro-inflammatory bacterial virulence factor*. Inflamm Res, 1995. **44**(5): p. 187-97.
66. O'Neill, L.A., *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 10-8.
67. Wilkins, C. and M. Gale, Jr., *Recognition of viruses by cytoplasmic sensors*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(1): p. 41-7.

68. Whitham, S., et al., *The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor*. Cell, 1994. **78**(6): p. 1101-15.
69. Botos, I., et al., *The toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1789**(9-10): p. 667-74.
70. Lien, E., et al., *Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33419-25.
71. Boehme, K.W., M. Guerrero, and T. Compton, *Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7094-102.
72. Lotze, M.T. and K.J. Tracey, *High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 331-42.
73. Lundberg, A.M. and G.K. Hansson, *Innate immune signals in atherosclerosis*. Clin Immunol, 2010. **134**(1): p. 5-24.
74. Mullick, A.E., P.S. Tobias, and L.K. Curtiss, *Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3149-56.
75. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
76. Xiao, X., et al., *Inflammatory regulation by TLR3 in acute hepatitis*. J Immunol, 2009. **183**(6): p. 3712-9.
77. Ospelt, C., et al., *Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(12): p. 3684-92.
78. Pirie, F.J., et al., *Toll-like receptor 3 gene polymorphisms in South African Blacks with type 1 diabetes*. Tissue Antigens, 2005. **66**(2): p. 125-30.
79. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
80. Imai, Y., et al., *Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury*. Cell, 2008. **133**(2): p. 235-49.
81. Xu, X.H., et al., *Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL*. Circulation, 2001. **104**(25): p. 3103-8.

82. Kiechl, S., et al., *Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis*. N Engl J Med, 2002. **347**(3): p. 185-92.
83. Hayashi, F., et al., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1099-103.
84. Rakoff-Nahoum, S., et al., *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. Cell, 2004. **118**(2): p. 229-41.
85. Deng, J., et al., *Toll-like receptors 4 and 5 induce distinct types of vasculitis*. Circ Res, 2009. **104**(4): p. 488-95.
86. Blohmke, C.J., et al., *Innate immunity mediated by TLR5 as a novel antiinflammatory target for cystic fibrosis lung disease*. J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7764-73.
87. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
88. Gorden, K.K., et al., *Oligodeoxynucleotides differentially modulate activation of TLR7 and TLR8 by imidazoquinolines*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 8164-70.
89. Drexler, S.K. and B.M. Foxwell, *The role of toll-like receptors in chronic inflammation*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(4): p. 506-18.
90. Haas, T., et al., *The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation*. Immunity, 2008. **28**(3): p. 315-23.
91. Leadbetter, E.A., et al., *Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors*. Nature, 2002. **416**(6881): p. 603-7.
92. Lazarus, R., et al., *Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies*. Genomics, 2003. **81**(1): p. 85-91.
93. Pichlmair, A., et al., *RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates*. Science, 2006. **314**(5801): p. 997-1001.
94. Malathi, K., et al., *Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity*. Nature, 2007. **448**(7155): p. 816-9.
95. Saito, T., et al., *Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 523-7.

96. Kato, H., et al., *Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1601-10.
97. Rehwinkel, J., et al., *RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection*, 2010. Cell. **140**(3): p. 397-408.
98. Loo, Y.M., et al., *Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 335-45.
99. Besch, R., et al., *Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells*. J Clin Invest, 2009. **119**(8): p. 2399-411.
100. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
101. Nejentsev, S., et al., *Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes*. Science, 2009. **324**(5925): p. 387-9.
102. Chamaillard, M., et al., *An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 702-7.
103. Girardin, S.E., et al., *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
104. Sabbah, A., et al., *Activation of innate immune antiviral responses by Nod2*. Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1073-80.
105. Cho, J.H., *The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 458-66.
106. Duewell, P., et al., *NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1357-61.
107. Mariathasan, S., et al., *Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 228-32.
108. Martinon, F., et al., *Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome*. Nature, 2006. **440**(7081): p. 237-41.
109. Yoshitomi, H., et al., *A role for fungal  $\beta$ -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice*. J Exp Med, 2005. **201**(6): p. 949-60.



110. Ishikawa, E., et al., *Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 2879-88.
111. Yamasaki, S., et al., *Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(10): p. 1179-88.
112. Dunn, S., et al., *The lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor: a pro-inflammatory factor in vascular disease*. Biochem J, 2008. **409**(2): p. 349-55.
113. Mehta, J.L., et al., *Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet*. Circ Res, 2007. **100**(11): p. 1634-42.
114. Endemann, G., et al., *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11811-6.
115. Ohgami, N., et al., *CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **947**: p. 350-5.
116. Febbraio, M., et al., *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice*. J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1049-56.
117. Schmidt, A.M., et al., *Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products*. J Clin Invest, 1993. **91**(5): p. 2155-68.
118. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
119. Harja, E., et al., *Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE<sup>-/-</sup> mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 183-94.
120. Guan, Y., et al., *Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5094-103.
121. Ozinsky, A., et al., *The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13766-71.
122. Akashi-Takamura, S. and K. Miyake, *TLR accessory molecules*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(4): p. 420-5.
123. Nagai, Y., et al., *Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 667-72.

124. Kim, Y.M., et al., *UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes*. Nature, 2008. **452**(7184): p. 234-8.
125. Takahashi, K., et al., *A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 2963-76.
126. Jenkins, K.A. and A. Mansell, *TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling*. Cytokine, 2010. **49**(3): p. 237-44.
127. Hacker, H. and M. Karin, *Regulation and function of IKK and IKK-related kinases*. Sci STKE, 2006. **2006**(357): p. re13.
128. Mercurio, F., et al., *IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation*. Science, 1997. **278**(5339): p. 860-6.
129. Bonnard, M., et al., *Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription*. EMBO J, 2000. **19**(18): p. 4976-85.
130. Tojima, Y., et al., *NAK is an IkappaB kinase-activating kinase*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 778-82.
131. Pomerantz, J.L. and D. Baltimore, *NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase*. EMBO J, 1999. **18**(23): p. 6694-704.
132. Shimada, T., et al., *IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases*. Int Immunol, 1999. **11**(8): p. 1357-62.
133. Yang, H., et al., *Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20861-6.
134. Halazonetis, T.D., et al., *c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities*. Cell, 1988. **55**(5): p. 917-24.
135. Wisdom, R., *AP-1: one switch for many signals*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 180-5.
136. Genin, P., et al., *Regulation of RANTES chemokine gene expression requires cooperativity between NF-kappa B and IFN-regulatory factor transcription factors*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5352-61.

137. Roebuck, K.A., *Regulation of interleukin-8 gene expression*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(5): p. 429-38.
138. Makela, S.M., et al., *Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(4): p. 664-72.
139. Burns, K., et al., *MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**(20): p. 12203-9.
140. Nunez Miguel, R., et al., *A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins*. PLoS One, 2007. **2**(8): p. e788.
141. Mansell, A., et al., *Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation*. Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 148-55.
142. Oshiumi, H., et al., *TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction*. Nat Immunol, 2003. **4**(2): p. 161-7.
143. Jiang, Z., et al., *Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3533-8.
144. Han, K.J., et al., *Analysis of a TIR-less splice variant of TRIF reveals an unexpected mechanism of TLR3-mediated signaling*. J Biol Chem, 2010. **285**(17): p. 12543-50.
145. Rowe, D.C., et al., *The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(16): p. 6299-304.
146. Janssens, S., et al., *MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappaB- and AP-1-dependent gene expression*. FEBS Lett, 2003. **548**(1-3): p. 103-7.
147. Palsson-McDermott, E.M., et al., *TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 579-86.
148. Yamamoto, M., K. Takeda, and S. Akira, *TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling*. Mol Immunol, 2004. **40**(12): p. 861-8.
149. Honda, K., et al., *IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses*. Nature, 2005. **434**(7034): p. 772-7.

150. Dai, J., et al., *Regulation of IFN regulatory factor-7 and IFN-alpha production by enveloped virus and lipopolysaccharide in human plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1535-48.
151. Sweeney, S.E., T.B. Kimbler, and G.S. Firestein, *Synoviocyte innate immune responses: II. Pivotal role of IFN regulatory factor 3*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 7162-8.
152. Giordano, G., et al., *Type I interferon signaling contributes to chronic inflammation in a murine model of silicosis*. Toxicol Sci, 2010. **116**(2):682-92.
153. Takaoka, A., et al., *Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors*. Nature, 2005. **434**(7030): p. 243-9.
154. Zapata, J.M., S. Lefebvre, and J.C. Reed, *Targeting TRAFs for therapeutic intervention*. Adv Exp Med Biol, 2007. **597**: p. 188-201.
155. Cuenda, A. and S. Rousseau, *p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1358-75.
156. Kontoyiannis, D., et al., *Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies*. Immunity, 1999. **10**(3): p. 387-98.
157. Hedges, J.C., et al., *A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24211-9.
158. Heuertz, R.M., et al., *C-reactive protein inhibits chemotactic peptide-induced p38 mitogen-activated protein kinase activity and human neutrophil movement*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17968-74.
159. Kotlyarov, A., et al., *MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(2): p. 94-7.
160. Ridley, S.H., et al., *A p38 MAP kinase inhibitor regulates stability of interleukin-1-induced cyclooxygenase-2 mRNA*. FEBS Lett, 1998. **439**(1-2): p. 75-80.
161. Shapiro, L. and C.A. Dinarello, *Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12230-4.
162. Katsargyris, A., et al., *Enhanced TLR4 endothelial cell immunohistochemical expression in symptomatic carotid atherosclerotic plaques*. Expert Opin Ther Targets, 2010. **14**(1): p. 1-10.

163. Candia, L., et al., *Toll-like receptor-2 expression is upregulated in antigen-presenting cells from patients with psoriatic arthritis: a pathogenic role for innate immunity?* J Rheumatol, 2007. **34**(2): p. 374-9.
164. Devaraj, S., et al., *Demonstration of increased toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in monocytes of type 1 diabetes mellitus patients with microvascular complications.* Metabolism, 2011. **60**(2):256-9.
165. Furuta, T., et al., *DNA demethylation-dependent enhancement of toll-like receptor-2 gene expression in cystic fibrosis epithelial cells involves SPI-activated transcription.* BMC Mol Biol, 2008. **9**: p. 39.
166. Taura, M., et al., *p53 regulates Toll-like receptor 3 expression and function in human epithelial cell lines.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(21): p. 6557-67.
167. Sanghavi, S.K. and T.A. Reinhart, *Increased expression of TLR3 in lymph nodes during simian immunodeficiency virus infection: implications for inflammation and immunodeficiency.* J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5314-23.
168. Liu, P., et al., *Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells.* J Virol, 2007. **81**(3): p. 1401-11.
169. Hardy, M.P., G.A.F. Mc, and L.A. O'Neill, *Transcriptional regulation of the human TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta) gene.* Biochem J, 2004. **380**(Pt 1): p. 83-93.
170. Steinhardt, A.P., et al., *A functional nonsynonymous toll-like receptor 4 gene polymorphism is associated with metabolic syndrome, surrogates of insulin resistance, and syndromes of lipid accumulation.* Metabolism, 2010. **59**(5): p. 711-7.
171. Barber, R.C., et al., *Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury.* Clin Med Res, 2006. **4**(4): p. 250-5.
172. Hold, G.L., et al., *A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors.* Gastroenterology, 2007. **132**(3): p. 905-12.
173. Boraska Jelavic, T., et al., *Microsatellite GT polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with colorectal cancer.* Clin Genet, 2006. **70**(2): p. 156-60.
174. Ferwerda, B., et al., *Functional and genetic evidence that the Mal/TIRAP allele variant 180L has been selected by providing protection against septic shock.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(25): p. 10272-7.

175. Barral, P.M., et al., *Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity*. Pharmacol Ther, 2009. **124**(2): p. 219-34.
176. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2851-8.
177. Satoh, T., et al., *LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1512-7.
178. Colli, M.L., et al., *MDA5 and PTPN2, two candidate genes for type 1 diabetes, modify pancreatic beta-cell responses to the viral by-product double-stranded RNA*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(1): p. 135-46.
179. Pothlichet, J., et al., *Study of human RIG-I polymorphisms identifies two variants with an opposite impact on the antiviral immune response*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7582.
180. Schneider, D., et al., *Increased Cytokine Response of Rhinovirus-infected Airway Epithelial Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(3):332-40.
181. Livengood, A.J., C.C. Wu, and D.A. Carson, *Opposing roles of RNA receptors TLR3 and RIG-I in the inflammatory response to double-stranded RNA in a Kaposi's sarcoma cell line*. Cell Immunol, 2007. **249**(2): p. 55-62.
182. Kubler, K., et al., *Targeted Activation of RNA Helicase Retinoic Acid-Inducible Gene-1 Induces Proimmunogenic Apoptosis of Human Ovarian Cancer Cells*. Cancer Res, 2010. **70**(13):5293-304
183. Imaizumi, T., et al., *Involvement of retinoic acid-inducible gene-1 in inflammation of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes*. Clin Exp Immunol, 2008. **153**(2): p. 240-4.
184. Mukherjee, A., et al., *Retinoic acid-induced gene-1 (RIG-I) associates with the actin cytoskeleton via caspase activation and recruitment domain-dependent interactions*. J Biol Chem, 2009. **284**(10): p. 6486-94.
185. Bryant, C. and K.A. Fitzgerald, *Molecular mechanisms involved in inflammasome activation*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(9): p. 455-64.
186. Koonin, E.V. and L. Aravind, *The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(5): p. 223-4.

187. Inohara, N. and G. Nunez, *The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens*. *Oncogene*, 2001. **20**(44): p. 6473-81.
188. Ahlquist, P., *Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses*. *Nat Rev Microbiol*, 2006. **4**(5): p. 371-82.
189. Takahasi, K., et al., *Nonsel self RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses*. *Mol Cell*, 2008. **29**(4): p. 428-40.
190. Meylan, E., et al., *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. *Nature*, 2005. **437**(7062): p. 1167-72.
191. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*. *Cell*, 2005. **122**(5): p. 669-82.
192. Kawai, T., et al., *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(10): p. 981-8.
193. Michallet, M.C., et al., *TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway*. *Immunity*, 2008. **28**(5): p. 651-61.
194. Zhang, P., et al., *Protein kinase PKR-dependent activation of mitogen-activated protein kinases occurs through mitochondrial adapter IPS-1 and is antagonized by vaccinia virus E3L*. *J Virol*, 2009. **83**(11): p. 5718-25.
195. Zhang, P. and C.E. Samuel, *Induction of protein kinase PKR-dependent activation of interferon regulatory factor 3 by vaccinia virus occurs through adapter IPS-1 signaling*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(50): p. 34580-7.
196. Heylbroeck, C., et al., *The IRF-3 transcription factor mediates Sendai virus-induced apoptosis*. *J Virol*, 2000. **74**(8): p. 3781-92.
197. Goubau, D., et al., *Transcriptional re-programming of primary macrophages reveals distinct apoptotic and anti-tumoral functions of IRF-3 and IRF-7*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(2): p. 527-40.
198. Kirshner, J.R., et al., *Identification of TRAIL as an interferon regulatory factor 3 transcriptional target*. *J Virol*, 2005. **79**(14): p. 9320-4.
199. Grandvaux, N., et al., *Regulation of arginase II by interferon regulatory factor 3 and the involvement of polyamines in the antiviral response*. *FEBS J*, 2005. **272**(12): p. 3120-31.

200. Chattopadhyay, S., et al., *Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax*. EMBO J, 2010. **29**(10): p. 1762-73.
201. Park, H.H., et al., *The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 561-86.
202. Yang, Y.L. and X.M. Li, *The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities*. Cell Res, 2000. **10**(3): p. 169-77.
203. Maeda, S., et al., *Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing*. Science, 2005. **307**(5710): p. 734-8.
204. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
205. Fantuzzi, G. and C.A. Dinarello, *Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1)*. J Clin Immunol, 1999. **19**(1): p. 1-11.
206. Brain, O., P. Allan, and A. Simmons, *NOD2-mediated autophagy and Crohn disease*. Autophagy, 2010. **6**(3): p. 412-4.
207. Yamamoto, S. and X. Ma, *Role of Nod2 in the development of Crohn's disease*. Microbes Infect, 2009. **11**(12): p. 912-8.
208. Miao, Z.M., et al., *NALP3 inflammasome functional polymorphisms and gout susceptibility*. Cell Cycle, 2009. **8**(1): p. 27-30.
209. Halle, A., et al., *The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta*. Nat Immunol, 2008. **9**(8): p. 857-65.
210. Rathinam, V.A., et al., *The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 395-402.
211. Choubey, D. and R. Panchanathan, *Interferon-inducible Ifi200-family genes in systemic lupus erythematosus*. Immunol Lett, 2008. **119**(1-2): p. 32-41.
212. Krieg, A., et al., *XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(34): p. 14524-9.
213. Galban, S. and C.S. Duckett, *XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling*. Cell Death Differ, 2010. **17**(1): p. 54-60.
214. Navas, T.A., D.T. Baldwin, and T.A. Stewart, *RIP2 is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33684-90.



215. Usluoglu, N., et al., *RIP2 mediates LPS-induced p38 and IkappaBalpha signaling including IL-12 p40 expression in human monocyte-derived dendritic cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(8): p. 2317-25.
216. Hasegawa, M., et al., *A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation*. EMBO J, 2008. **27**(2): p. 373-83.
217. Landstrom, M., *The TAK1-TRAF6 signalling pathway*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(5): p. 585-9.
218. Travassos, L.H., et al., *Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 55-62.
219. Martinon, F., *Signaling by ROS drives inflammasome activation*. Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 616-9.
220. Agostini, L., et al., *NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder*. Immunity, 2004. **20**(3): p. 319-25.
221. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill, *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity*. Trends Immunol, 2006. **27**(8): p. 352-7.
222. Wautier, J.L. and P.J. Guillausseau, *Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy*. Diabetes Metab, 2001. **27**(5 Pt 1): p. 535-42.
223. Ishigaki, Y., Y. Oka, and H. Katagiri, *Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor*. Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(5): p. 363-9.
224. Weinbrenner, T., et al., *Circulating oxidized LDL is associated with increased waist circumference independent of body mass index in men and women*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(1): p. 30-5; quiz 181-2.
225. Matsumoto, K., et al., *Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(4): p. 1027-32.
226. Brett, J., et al., *Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues*. Am J Pathol, 1993. **143**(6): p. 1699-712.

227. Nozaki, S., et al., *Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 1859-65.
228. Cho, S., et al., *The class B scavenger receptor CD36 mediates free radical production and tissue injury in cerebral ischemia*. J Neurosci, 2005. **25**(10): p. 2504-12.
229. Stewart, C.R., et al., *CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 155-61.
230. Farmer, D.G. and S. Kennedy, *RAGE, vascular tone and vascular disease*. Pharmacol Ther, 2009. **124**(2): p. 185-94.
231. Moore, K.J. and M.W. Freeman, *Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1702-11.
232. Rozenberg, I., et al., *Histamine H1 receptor promotes atherosclerotic lesion formation by increasing vascular permeability for low-density lipoproteins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(5): p. 923-30.
233. Dvorak, A.M., *Mast cell-derived mediators of enhanced microvascular permeability, vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, histamine, and serotonin, cause leakage of macromolecules through a new endothelial cell permeability organelle, the vesiculo-vacuolar organelle*. Chem Immunol Allergy, 2005. **85**: p. 185-204.
234. Wang, Z., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta6 (CaMKIIdelta6) and RhoA involvement in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction*. J Biol Chem, 2010. **285**(28):21303-12.
235. Keck, P.J., et al., *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF*. Science, 1989. **246**(4935): p. 1309-12.
236. Dvorak, H.F., *Discovery of vascular permeability factor (VPF)*. Exp Cell Res, 2006. **312**(5): p. 522-6.
237. Kuebler, W.M., et al., *Vascular barrier regulation by PAF, ceramide, caveolae, and NO - an intricate signaling network with discrepant effects in the pulmonary and systemic vasculature*. Cell Physiol Biochem, 2010. **26**(1): p. 29-40.
238. Henderson, W.R., Jr., *The role of leukotrienes in inflammation*. Ann Intern Med, 1994. **121**(9): p. 684-97.

239. Sessa, W.C., *Molecular control of blood flow and angiogenesis: role of nitric oxide*. J Thromb Haemost, 2009. **7 Suppl 1**: p. 35-7.
240. Dworakowski, R., S.P. Alom-Ruiz, and A.M. Shah, *NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype*. Pharmacol Rep, 2008. **60**(1): p. 21-8.
241. Komarova, Y. and A.B. Malik, *Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 463-93.
242. Sarma, V.J., M. Huber-Lang, and P.A. Ward, *Complement in lung disease*. Autoimmunity, 2006. **39**(5): p. 387-94.
243. Dunkelberger, J.R. and W.C. Song, *Complement and its role in innate and adaptive immune responses*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 34-50.
244. Peng, Y., et al., *The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells*. Mol Immunol, 2005. **42**(7): p. 781-7.
245. Duchene, J. and A. Ahluwalia, *The kinin B(1) receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(2): p. 125-31.
246. Del Rosso, M., et al., *The plasminogen activation system in inflammation*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 4667-86.
247. Martorell, L., et al., *Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2008. **99**(2): p. 305-15.
248. Geng, J.G., et al., *Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140*. Nature, 1990. **343**(6260): p. 757-60.
249. Frenette, P.S., et al., *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7450-4.
250. McEver, R.P., *GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium*. J Cell Biochem, 1991. **45**(2): p. 156-61.
251. Cavender, D.E., et al., *Interleukin 1 increases the binding of human B and T lymphocytes to endothelial cell monolayers*. J Immunol, 1986. **136**(1): p. 203-7.

252. Shimizu, Y., et al., *Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions*. J Cell Biol, 1991. **113**(5): p. 1203-12.
253. Schulz, K.R. and J. Scheibe, *[Purulent meningitis of rhinogenic or otogenic origin--a contribution to the clinical problem]*. Z Arztl Fortbild (Jena), 1989. **83**(17): p. 865-7.
254. Weller, A., S. Isenmann, and D. Vestweber, *Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha*. J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 15176-83.
255. Piqueras, L., et al., *Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation*. Circulation, 2000. **102**(17): p. 2118-23.
256. Pinsky, D.J., et al., *Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation*. J Clin Invest, 1996. **97**(2): p. 493-500.
257. Picker, L.J., et al., *ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells*. Nature, 1991. **349**(6312): p. 796-9.
258. Montgomery, K.F., et al., *Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(15): p. 6523-7.
259. Bandyopadhyay, S., et al., *HOXA9 participates in the transcriptional activation of E-selectin in endothelial cells*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(12): p. 4207-16.
260. Fahmy, R.G., et al., *Suppression of vascular permeability and inflammation by targeting of the transcription factor c-Jun*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(7): p. 856-63.
261. Higai, K., A. Shimamura, and K. Matsumoto, *Amadori-modified glycated albumin predominantly induces E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells through NADPH oxidase activation*. Clin Chim Acta, 2006. **367**(1-2): p. 137-43.
262. Chandrasekharan, U.M., et al., *Role of CL-100, a dual specificity phosphatase, in thrombin-induced endothelial cell activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46678-85.
263. SenBanerjee, S., et al., *KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation*. J Exp Med, 2004. **199**(10): p. 1305-15.

264. Baer, J.T., et al., *Nuclear factor-kappaB activation in endothelium by Chlamydia pneumoniae without active infection*. J Infect Dis, 2003. **188**(8): p. 1094-7.
265. Bandyopadhyay, S.K., C.A. de La Motte, and B.R. Williams, *Induction of E-selectin expression by double-stranded RNA and TNF-alpha is attenuated in murine aortic endothelial cells derived from double-stranded RNA-activated kinase (PKR)-null mice*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 2077-83.
266. Palmethofer, A., S.C. Robson, and V. Nehls, *Lysophosphatidic acid activates nuclear factor kappa B and induces proinflammatory gene expression in endothelial cells*. Thromb Haemost, 1999. **82**(5): p. 1532-7.
267. Grafe, M., et al., *Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin*. Circ Res, 1997. **81**(5): p. 804-11.
268. Warfel, J.M. and F. D'Agnillo, *Anthrax lethal toxin enhances TNF-induced endothelial VCAM-1 expression via an IFN regulatory factor-1-dependent mechanism*. J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7516-24.
269. Costanzo, A., et al., *Endothelial activation by angiotensin II through NFkappaB and p38 pathways: Involvement of NFkappaB-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin*. J Cell Physiol, 2003. **195**(3): p. 402-10.
270. Faruqi, T.R., et al., *Role of nitric oxide in poly(I-C)-induced endothelial cell expression of leukocyte adhesion molecules*. Am J Physiol, 1997. **273**(5 Pt 2): p. H2490-7.
271. Xue, J., et al., *NF-kappaB regulates thrombin-induced ICAM-1 gene expression in cooperation with NFAT by binding to the intronic NF-kappaB site in the ICAM-1 gene*. Physiol Genomics, 2009. **38**(1): p. 42-53.
272. Zund, G., et al., *Hypoxia enhances induction of endothelial ICAM-1: role for metabolic acidosis and proteasomes*. Am J Physiol, 1997. **273**(5 Pt 1): p. C1571-80.
273. Sultana, C., et al., *Cobalt chloride-induced signaling in endothelium leading to the augmented adherence of sickle red blood cells and transendothelial migration of monocyte-like HL-60 cells is blocked by PAF-receptor antagonist*. J Cell Physiol, 1999. **179**(1): p. 67-78.
274. Walter, M.J., et al., *Targeted inhibition of interferon-gamma-dependent intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression using dominant-negative Stat1*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28582-9.

275. Naik, S.M., et al., *Interferon gamma-dependent induction of human intercellular adhesion molecule-1 gene expression involves activation of a distinct STAT protein complex*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1283-90.
276. Suter, E., *Interaction between phagocytes and pathogenic microorganisms*. Bacteriol Rev, 1956. **20**(2): p. 94-132.
277. Newman, S.L. and M.A. Tucci, *Regulation of human monocyte/macrophage function by extracellular matrix. Adherence of monocytes to collagen matrices enhances phagocytosis of opsonized bacteria by activation of complement receptors and enhancement of Fc receptor function*. J Clin Invest, 1990. **86**(3): p. 703-14.
278. Savill, J.S., et al., *Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages*. J Clin Invest, 1989. **83**(3): p. 865-75.
279. Adamson, R., *Role of macrophages in normal wound healing: an overview*. J Wound Care, 2009. **18**(8): p. 349-51.
280. Theilgaard-Monch, K., et al., *The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7684-93.
281. von Philipsborn, A. and M. Bastmeyer, *Mechanisms of gradient detection: a comparison of axon pathfinding with eukaryotic cell migration*. Int Rev Cytol, 2007. **263**: p. 1-62.
282. Le, Y., P.M. Murphy, and J.M. Wang, *Formyl-peptide receptors revisited*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 541-8.
283. Waugh, D.J. and C. Wilson, *The interleukin-8 pathway in cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 6735-41.
284. Atkinson, Y.H., et al., *Human tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) directly stimulates arachidonic acid release in human neutrophils*. Immunology, 1990. **70**(1): p. 82-7.
285. Pay, S., et al., *Chimerical anti-TNF-alpha, infliximab, inhibits neutrophil chemotaxis and production of reactive oxygen species by blocking the priming effect of mononuclear cells on neutrophils*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2005. **27**(2): p. 187-98.
286. Sanidas, D., A. Garnham, and R. Mian, *Activation of human leukocytes by acute hypoxia*. Exp Physiol, 2000. **85**(3): p. 263-6.

287. Tamura, D.Y., et al., *Acute hypoxemia in humans enhances the neutrophil inflammatory response*. Shock, 2002. **17**(4): p. 269-73.
288. Deguchi, J.O., et al., *Chronic hypoxia activates the Akt and beta-catenin pathways in human macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(10): p. 1664-70.
289. Murdoch, C., M. Muthana, and C.E. Lewis, *Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6257-63.
290. Vogelberg, K.H. and M. Konig, *Hypoxia of diabetic feet with abnormal arterial blood flow*. Clin Investig, 1993. **71**(6): p. 466-70.
291. Nizet, V. and R.S. Johnson, *Interdependence of hypoxic and innate immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(9): p. 609-17.
292. Zarbock, A. and K. Ley, *Neutrophil adhesion and activation under flow*. Microcirculation, 2009. **16**(1): p. 31-42.
293. McLeish, K.R., et al., *Bacterial phagocytosis activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase cascades in human neutrophils*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(6): p. 835-44.
294. Nathan, C., *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 173-82.
295. Mathias, J.R., et al., *Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1281-8.
296. Cao, C., et al., *A specific role of integrin Mac-1 in accelerated macrophage efflux to the lymphatics*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3234-41.
297. Schwab, J.M., et al., *Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes*. Nature, 2007. **447**(7146): p. 869-74.
298. Kobayashi, S.D., et al., *Gene expression profiling provides insight into the pathophysiology of chronic granulomatous disease*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 636-43.
299. Majno, G. and I. Joris, *Cells, tissues, and disease : principles of general pathology*. 2nd ed. 2004, New York: Oxford University Press. xxviii, 1005.
300. Sluimer, J.C., et al., *Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(13): p. 1258-65.

301. Sluimer, J.C. and M.J. Daemen, *Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis*. J Pathol, 2009. **218**(1): p. 7-29.
302. Kumamoto, M., Y. Nakashima, and K. Sueishi, *Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance*. Hum Pathol, 1995. **26**(4): p. 450-6.
303. Moreno, P.R., et al., *Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability*. Circulation, 2004. **110**(14): p. 2032-8.
304. Ribatti, D., F. Levi-Schaffer, and P.T. Kovanen, *Inflammatory angiogenesis in atherogenesis--a double-edged sword*. Ann Med, 2008. **40**(8): p. 606-21.
305. Walsh, D.A., et al., *Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford) , 2010. **49**(10):1852-61.
306. Nishimura, S., et al., *Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels*. Diabetes, 2007. **56**(6): p. 1517-26.
307. Amarapurkar, A.D., et al., *Angiogenesis in chronic liver disease*. Ann Hepatol, 2007. **6**(3): p. 170-3.
308. Cohen, S., *Cytokine: more than a new word, a new concept proposed by Stanley Cohen thirty years ago*. Cytokine, 2004. **28**(6): p. 242-7.
309. Mantovani, A., C.A. Dinarello, and P. Ghezzi, *Pharmacology of cytokines*. 2000, Oxford ; Toronto: Oxford University Press. x, 329 , [1] f. de pl.
310. Dinarello, C.A., *Historical insights into cytokines*. Eur J Immunol, 2007. **37 Suppl 1**: p. S34-45.
311. Barksby, H.E., et al., *The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders*. Clin Exp Immunol, 2007. **149**(2): p. 217-25.
312. Chelbi-Alix, M.K. and J. Wietzerbin, *Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research*. Biochimie, 2007. **89**(6-7): p. 713-8.
313. Dinarello, C.A., *Anti-inflammatory Agents: Present and Future*. Cell, 2010. **140**(6): p. 935-50.
314. Rang, H.P., *Pharmacology*. 5th ed. 2003, Edinburgh ; Toronto: Churchill Livingstone. xii, 797.



315. Das, U.N., *COX-2 inhibitors and metabolism of essential fatty acids*. Med Sci Monit, 2005. **11**(7): p. RA233-7.
316. Sanghi, S., et al., *Cyclooxygenase-2 inhibitors: a painful lesson*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2006. **6**(2): p. 85-100.
317. Maradit-Kremers, H., et al., *Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(3): p. 722-32.
318. Asanuma, Y., et al., *Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2003. **349**(25): p. 2407-15.
319. Jacobsson, L.T., et al., *Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2005. **32**(7): p. 1213-8.
320. Emsley, H.C., et al., *A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005. **76**(10): p. 1366-72.
321. Black, R.A., et al., *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells*. Nature, 1997. **385**(6618): p. 729-33.
322. Falvo, J.V., A.V. Tsytsykova, and A.E. Goldfeld, *Transcriptional control of the TNF gene*. Curr Dir Autoimmun, 2010. **11**: p. 27-60.
323. Han, J., T. Brown, and B. Beutler, *Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level*. J Exp Med, 1990. **171**(2): p. 465-75.
324. Bradley, J.R., *TNF-mediated inflammatory disease*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 149-60.
325. Imaizumi, T., et al., *Expression of tumor necrosis factor-alpha in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or interleukin-1alpha*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(2): p. 410-5.
326. Sprague, A.H. and R.A. Khalil, *Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease*. Biochem Pharmacol, 2009. **78**(6): p. 539-52.
327. Moore, R.J., et al., *Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis*. Nat Med, 1999. **5**(7): p. 828-31.

328. Park, E.J., et al., *Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression*. Cell, 2010. **140**(2): p. 197-208.
329. Aringer, M. and J.S. Smolen, *Tumour necrosis factor and other proinflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: a rationale for therapeutic intervention*. Lupus, 2004. **13**(5): p. 344-7.
330. McIntire, C.R., G. Yeretssian, and M. Saleh, *Inflammasomes in infection and inflammation*. Apoptosis, 2009. **14**(4): p. 522-35.
331. Fang, H.Y., et al., *Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia*. Blood, 2009. **114**(4): p. 844-59.
332. Apostolakis, S., et al., *IL-1 cytokines in cardiovascular disease: diagnostic, prognostic and therapeutic implications*. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2008. **6**(2): p. 150-8.
333. Matsusaka, T., et al., *Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10193-7.
334. An, J., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encoded vFLIP induces cellular IL-6 expression: the role of the NF-kappaB and JNK/AP1 pathways*. Oncogene, 2003. **22**(22): p. 3371-85.
335. Aarden, L., et al., *Differential induction of interleukin-6 production in monocytes, endothelial cells and smooth muscle cells*. Eur Cytokine Netw, 1991. **2**(2): p. 115-20.
336. Schuett, H., et al., *How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 215-22.
337. Asanuma, Y., et al., *Increased concentration of proatherogenic inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to cardiovascular risk factors*. J Rheumatol, 2006. **33**(3): p. 539-45.
338. Kim, J., et al., *Hypoxia-induced IL-18 increases hypoxia-inducible factor-1alpha expression through a Rac1-dependent NF-kappaB pathway*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(2): p. 433-44.
339. Golab, J., *Interleukin 18--interferon gamma inducing factor--a novel player in tumour immunotherapy?* Cytokine, 2000. **12**(4): p. 332-8.

340. Chandrasekar, B., et al., *Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappaB- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin*. J Biol Chem, 2006. **281**(22): p. 15099-109.
341. Nabata, T., et al., *Interleukin-6 stimulates c-myc expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells*. Biochem Int, 1990. **20**(3): p. 445-53.
342. Dinarello, C.A., *Interleukin-18 and the pathogenesis of inflammatory diseases*. Semin Nephrol, 2007. **27**(1): p. 98-114.
343. Liu, P., et al., *Regulation of inflammatory cytokine expression in pulmonary epithelial cells by pre-B-cell colony-enhancing factor via a nonenzymatic and AP-1-dependent mechanism*. J Biol Chem, 2009. **284**(40): p. 27344-51.
344. Braunersreuther, V., F. Mach, and S. Steffens, *The specific role of chemokines in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2007. **97**(5): p. 714-21.
345. Boekhoudt, G.H., et al., *Communication between NF-kappa B and Sp1 controls histone acetylation within the proximal promoter of the monocyte chemoattractant protein 1 gene*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4139-47.
346. Tzima, S., et al., *Myeloid heme oxygenase-1 regulates innate immunity and autoimmunity by modulating IFN-beta production*. J Exp Med, 2009. **206**(5): p. 1167-79.
347. O'Hayre, M., et al., *Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment*. Biochem J, 2008. **409**(3): p. 635-49.
348. Melgarejo, E., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(5): p. 998-1001.
349. Wu, L., et al., *Induction and regulation of matrix metalloproteinase-12 by cytokines and CD40 signaling in monocyte/macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **269**(3): p. 808-15.
350. Stamatovic, S.M., et al., *Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 22): p. 4615-28.
351. Denger, S., et al., *Expression of monocyte chemoattractant protein-1 cDNA in vascular smooth muscle cells: induction of the synthetic phenotype: a possible clue to SMC differentiation in the process of atherogenesis*. Atherosclerosis, 1999. **144**(1): p. 15-23.

352. Van Coillie, E., J. Van Damme, and G. Opdenakker, *The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines*. Cytokine Growth Factor Rev, 1999. **10**(1): p. 61-86.
353. de Lemos, J.A., et al., *Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes*. Circulation, 2003. **107**(5): p. 690-5.
354. Heller, E.A., et al., *Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells*. Circulation, 2006. **113**(19): p. 2301-12.
355. Stankovic, A., et al., *Serum and synovial fluid concentrations of CCL2 (MCP-1) chemokine in patients suffering rheumatoid arthritis and osteoarthritis reflect disease activity*. Bratisl Lek Listy, 2009. **110**(10): p. 641-6.
356. Soria, G. and A. Ben-Baruch, *The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer*. Cancer Lett, 2008. **267**(2): p. 271-85.
357. Cremer, I., J. Ghysdael, and V. Vieillard, *A non-classical ISRE/ISGF3 pathway mediates induction of RANTES gene transcription by type I IFNs*. FEBS Lett, 2002. **511**(1-3): p. 41-5.
358. Kovacic, J.C., et al., *Stat3-dependent acute Rantes production in vascular smooth muscle cells modulates inflammation following arterial injury in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 303-14.
359. Levy, J.A., *The unexpected pleiotropic activities of RANTES*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 3945-6.
360. Klier, C.M., et al., *Chemokine-Induced secretion of gelatinase B in primary human monocytes*. Biol Chem, 2001. **382**(9): p. 1405-10.
361. Nakaya, T., et al., *Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(5): p. 1150-6.
362. Ohmori, Y. and T.A. Hamilton, *Cooperative interaction between interferon (IFN) stimulus response element and kappa B sequence motifs controls IFN gamma- and lipopolysaccharide-stimulated transcription from the murine IP-10 promoter*. J Biol Chem, 1993. **268**(9): p. 6677-88.
363. Lee, E.Y., Z.H. Lee, and Y.W. Song, *CXCL10 and autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(5): p. 379-83.
364. Filen, S., et al., *Activating transcription factor 3 is a positive regulator of human IFNG gene expression*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 4990-9.

365. Harvey, E.J. and D.P. Ramji, *Interferon-gamma and atherosclerosis: pro- or anti-atherogenic?* Cardiovasc Res, 2005. **67**(1): p. 11-20.
366. McLaren, J.E. and D.P. Ramji, *Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis.* Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(2): p. 125-35.
367. Niessner, A., et al., *Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha.* Circulation, 2006. **114**(23): p. 2482-9.
368. Niessner, A., et al., *Synergistic proinflammatory effects of the antiviral cytokine interferon-alpha and Toll-like receptor 4 ligands in the atherosclerotic plaque.* Circulation, 2007. **116**(18): p. 2043-52.
369. Yamamoto, A., H. Sudo, and A. Endo, *Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia.* Atherosclerosis, 1980. **35**(3): p. 259-66.
370. Krukemyer, J.J. and R.L. Talbert, *Lovastatin: a new cholesterol-lowering agent.* Pharmacotherapy, 1987. **7**(6): p. 198-210.
371. Baigent, C., et al., *Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins.* Lancet, 2005. **366**(9493): p. 1267-78.
372. Arend, W.P., *The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease.* Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(4-5): p. 323-40.
373. Rhoades, R. and D.R. Bell, *Medical physiology : principles for clinical medicine.* 3rd ed. 2009, Philadelphia: Wolters KLUwer|Lippincott Williams & Wilkins. x, 816.
374. Gabay, C., *Interleukin-6 and chronic inflammation.* Arthritis Res Ther, 2006. **8 Suppl 2**: p. S3.
375. Marnell, L., C. Mold, and T.W. Du Clos, *C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation.* Clin Immunol, 2005. **117**(2): p. 104-11.
376. Deban, L., et al., *Pentraxins: multifunctional proteins at the interface of innate immunity and inflammation.* Biofactors, 2009. **35**(2): p. 138-45.
377. Kravitz, M.S., M. Pitashny, and Y. Shoenfeld, *Protective molecules--C-reactive protein (CRP), serum amyloid P (SAP), pentraxin3 (PTX3), mannose-binding lectin (MBL), and apolipoprotein A1 (Apo A1), and their autoantibodies: prevalence and clinical significance in autoimmunity.* J Clin Immunol, 2005. **25**(6): p. 582-91.

378. Dendorfer, U., P. Oettgen, and T.A. Libermann, *Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(7): p. 4443-54.
379. Scheller, J. and S. Rose-John, *Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside*. Med Microbiol Immunol, 2006. **195**(4): p. 173-83.
380. Althoff, K., et al., *Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins*. Eur J Biochem, 2000. **267**(9): p. 2624-31.
381. Rose-John, S. and P.C. Heinrich, *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function*. Biochem J, 1994. **300** ( Pt 2): p. 281-90.
382. Guschin, D., et al., *A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6*. EMBO J, 1995. **14**(7): p. 1421-9.
383. Akira, S., *IL-6-regulated transcription factors*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(12): p. 1401-18.
384. Hanlon, M., L.M. Bundy, and L. Sealy, *C/EBP beta and Elk-1 synergistically transactivate the c-fos serum response element*. BMC Cell Biol, 2000. **1**: p. 2.
385. Plevy, S.E., et al., *Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(8): p. 4572-88.
386. Betts, J.C., et al., *The role of NF-kappa B and NF-IL6 transactivating factors in the synergistic activation of human serum amyloid A gene expression by interleukin-1 and interleukin-6*. J Biol Chem, 1993. **268**(34): p. 25624-31.
387. Weihua, X., et al., *Interleukin-6 modulates interferon-regulated gene expression by inducing the ISGF3 gamma gene using CCAAT/enhancer binding protein-beta(C/EBP-beta)*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1492**(1): p. 163-71.
388. Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove, *STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(11): p. 798-809.
389. Romano, M., et al., *Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment*. Immunity, 1997. **6**(3): p. 315-25.
390. Dasu, M.R., et al., *Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts*. Burns, 2003. **29**(6): p. 527-31.

391. Fan, Y., et al., *Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28**(1): p. 90-8.
392. Jiang, G.X., et al., *IL-6/STAT3/TFF3 signaling regulates human biliary epithelial cell migration and wound healing in vitro*. Mol Biol Rep, 2010. **37**(8):3813-8.
393. Grivennikov, S.I. and M. Karin, *Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2010. **21**(1): p. 11-9.
394. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 145-76.
395. Shin, W.S., A. Szuba, and S.G. Rockson, *The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights*. Atherosclerosis, 2002. **160**(1): p. 91-102.
396. Taylor, P.C., et al., *Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(1): p. 38-47.
397. Saji, H., et al., *Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma*. Cancer, 2001. **92**(5): p. 1085-91.
398. Gazzaniga, S., et al., *Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(8): p. 2031-41.
399. Zhong, L., et al., *Dominant-negative mutation of monocyte chemoattractant protein-1 prevents vulnerable plaques from rupture in rabbits independent of serum lipid levels*. J Cell Mol Med, 2008. **12**(6A): p. 2362-71.
400. Ikeda, U., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease*. Clin Cardiol, 2002. **25**(4): p. 143-7.
401. Veillard, N.R., et al., *Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice*. Circ Res, 2004. **94**(2): p. 253-61.
402. Braunersreuther, V., et al., *A novel RANTES antagonist prevents progression of established atherosclerotic lesions in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(6): p. 1090-6.

403. Azenshtein, E., et al., *The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity*. Cancer Res, 2002. **62**(4): p. 1093-102.
404. Tang, C.H., et al., *Involvement of matrix metalloproteinase-3 in CCL5/CCR5 pathway of chondrosarcomas metastasis*. Biochem Pharmacol, 2010. **79**(2): p. 209-17.
405. Stamatovic, S.M., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability*. J Cereb Blood Flow Metab, 2005. **25**(5): p. 593-606.
406. Thelen, M., *Dancing to the tune of chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 129-34.
407. Ma, Y.C., et al., *Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins*. Cell, 2000. **102**(5): p. 635-46.
408. Guarino, M., *Src signaling in cancer invasion*. J Cell Physiol, 2010. **223**(1): p. 14-26.
409. Rozengurt, E., *Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors*. J Cell Physiol, 2007. **213**(3): p. 589-602.
410. Cohen-Hillel, E., et al., *Cell migration to the chemokine CXCL8: paxillin is activated and regulates adhesion and cell motility*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(5): p. 884-99.
411. Lee, J.S., E.J. Yang, and I.S. Kim, *The roles of MCP-1 and protein kinase C delta activation in human eosinophilic leukemia EoL-1 cells*. Cytokine, 2009. **48**(3): p. 186-95.
412. McCudden, C.R., et al., *G-protein signaling: back to the future*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(5): p. 551-77.
413. Ashida, N., et al., *Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16555-60.
414. Di Marzio, P., et al., *Role of Rho family GTPases in CCR1- and CCR5-induced actin reorganization in macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(4): p. 909-16.
415. Jimenez, F., et al., *CCR2 plays a critical role in dendritic cell maturation: possible role of CCL2 and NF-kappaB*. J Immunol, 2010. **184**(10): p. 5571-81.



416. Lee, M.M. and Y.H. Wong, *CCR1-mediated activation of Nuclear Factor-kappaB in THP-1 monocytic cells involves Pertussis Toxin-insensitive Galpha(14) and Galpha(16) signaling cascades*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(6): p. 1319-29.
417. Chuang, J.Y., et al., *CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells*. J Cell Physiol, 2009. **220**(2): p. 418-26.
418. Huang, C.Y., et al., *CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF-kappaB pathways*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(5): p. 794-803.
419. Itoh, Y., et al., *IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells*. Cytokine, 2005. **29**(6): p. 275-82.
420. Porcile, C., et al., *Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation*. Exp Cell Res, 2005. **308**(2): p. 241-53.
421. Keates, S., et al., *Macrophage-inflammatory protein-3alpha mediates epidermal growth factor receptor transactivation and ERK1/2 MAPK signaling in Caco-2 colonic epithelial cells via metalloproteinase-dependent release of amphiregulin*. J Immunol, 2007. **178**(12): p. 8013-21.
422. Chinni, S.R., et al., *CXCL12/CXCR4 transactivates HER2 in lipid rafts of prostate cancer cells and promotes growth of metastatic deposits in bone*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(3): p. 446-57.
423. Cheung, R., et al., *An arrestin-dependent multi-kinase signaling complex mediates MIP-1beta/CCL4 signaling and chemotaxis of primary human macrophages*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(4): p. 833-45.
424. Arefieva, T.I., et al., *MCP-1-stimulated chemotaxis of monocytic and endothelial cells is dependent on activation of different signaling cascades*. Cytokine, 2005. **31**(6): p. 439-46.
425. Johnson, Z., et al., *Chemokine inhibition--why, when, where, which and how?* Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 2): p. 366-77.
426. Cotton, M. and A. Claing, *G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration*. Cell Signal, 2009. **21**(7): p. 1045-53.
427. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1111-9.

428. Steinberg, H.O., et al., *Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance.* J Clin Invest, 1996. **97**(11): p. 2601-10.
429. Meyers, M.R. and N. Gokce, *Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis.* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2007. **14**(5): p. 365-9.
430. Marchesi, C., P. Paradis, and E.L. Schiffrin, *Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation.* Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(7): p. 367-74.
431. Genest, J., *C-reactive protein: risk factor, biomarker and/or therapeutic target?* Can J Cardiol, 2010. **26 Suppl A**: p. 41A-44A.
432. van Zonneveld, A.J., et al., *Inflammation, vascular injury and repair in rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis, 2010. **69 Suppl 1**: p. i57-60.
433. Sherer, Y., H. Zinger, and Y. Shoenfeld, *Atherosclerosis in systemic lupus erythematosus.* Autoimmunity, 2010. **43**(1): p. 98-102.
434. Zimmerman, M.A. and S.C. Flores, *Autoimmune-mediated oxidative stress and endothelial dysfunction: implications of accelerated vascular injury in type I diabetes.* J Surg Res, 2009. **155**(1): p. 173-8.
435. Alexandroff, A.B., et al., *More than skin deep: atherosclerosis as a systemic manifestation of psoriasis.* Br J Dermatol, 2009. **161**(1): p. 1-7.
436. Hettema, M.E., H. Bootsma, and C.G. Kallenberg, *Macrovascular disease and atherosclerosis in SSc.* Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(5): p. 578-83.
437. Elkind, M.S., *Infectious burden: a new risk factor and treatment target for atherosclerosis.* Infect Disord Drug Targets, 2010. **10**(2): p. 84-90.
438. Xu, K.P., et al., *High glucose suppresses epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and attenuates corneal epithelial wound healing.* Diabetes, 2009. **58**(5): p. 1077-85.
439. Koskela, M., et al., *Epidermal wound healing in severe sepsis and septic shock in humans.* Crit Care, 2009. **13**(3): p. R100.
440. Menke, N.B., et al., *Impaired wound healing.* Clin Dermatol, 2007. **25**(1): p. 19-25.
441. Hotamisligil, G.S., et al., *Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance.* J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2409-15.

442. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
443. Gouwy, M., et al., *Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(6): p. 561-80.
444. Sweet, M.J., et al., *Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of toll-like receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 392-9.
445. Merika, M., et al., *Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription*. Mol Cell, 1998. **1**(2): p. 277-87.
446. Gonzalez-Gay, M.A., et al., *Anti-tumor necrosis factor-alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2006. **24**(1): p. 83-6.
447. Ingegnoli, F., et al., *Anti-tumor necrosis factor alpha therapy normalizes fibrinolysis impairment in patients with active rheumatoid arthritis*. Clin Exp Rheumatol, 2010. **28**(2): p. 254-7.
448. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell. **140**(6): p. 883-99.
449. de Martel, C. and S. Franceschi, *Infections and cancer: established associations and new hypotheses*. Crit Rev Oncol Hematol, 2009. **70**(3): p. 183-94.
450. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
451. Guruvayoorappan, C., *Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link?* Integr Cancer Ther, 2008. **7**(2): p. 90-5.
452. Klaunig, J.E., L.M. Kamendulis, and B.A. Hocevar, *Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis*. Toxicol Pathol, 2010. **38**(1): p. 96-109.
453. Sallmyr, A., J. Fan, and F.V. Rassool, *Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair*. Cancer Lett, 2008. **270**(1): p. 1-9.
454. Grivennikov, S., et al., *IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer*. Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 103-13.

455. Karin, M. and F.R. Greten, *NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 749-59.
456. Prasad, S., J. Ravindran, and B.B. Aggarwal, *NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship*. Mol Cell Biochem, 2010. **336**(1-2): p. 25-37.
457. Catlett-Falcone, R., et al., *Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 105-15.
458. Bollrath, J., et al., *gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis*. Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 91-102.
459. Lee, H., et al., *Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors*. Cancer Cell, 2009. **15**(4): p. 283-93.
460. Grivennikov, S.I. and M. Karin, *Inflammation and oncogenesis: a vicious connection*. Curr Opin Genet Dev, 2010. **20**(1): p. 65-71.
461. Pollard, J.W., *Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(3): p. 623-30.
462. Bjornheden, T., et al., *Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(4): p. 870-6.
463. Graves, E.E. and A.J. Giaccia, *Imaging tumoral hypoxia: oxygen concentrations and beyond*. Oncology (Williston Park), 2007. **21**(3): p. 368-76; discussion 377-8, 384.
464. Ruan, K., G. Song, and G. Ouyang, *Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer*. J Cell Biochem, 2009. **107**(6): p. 1053-62.
465. Hoogsteen, I.J., et al., *The hypoxic tumour microenvironment, patient selection and hypoxia-modifying treatments*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2007. **19**(6): p. 385-96.
466. Bussink, J., J.H. Kaanders, and A.J. van der Kogel, *Microenvironmental transformations by VEGF- and EGF-receptor inhibition and potential implications for responsiveness to radiotherapy*. Radiother Oncol, 2007. **82**(1): p. 10-7.
467. Vaupel, P. and A. Mayer, *Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance*. Transfus Clin Biol, 2005. **12**(1): p. 5-10.

468. Park, J.E., et al., *Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(6): p. 1085-99.
469. Rouschop, K.M., et al., *The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 127-41.
470. Werno, C., et al., *Knockout of Hif-1alpha in Tumor-Associated Macrophages Enhances M2 Polarization and Attenuates Their Pro-Angiogenic Responses*. Carcinogenesis, 2010. **31**(10):1863-72.
471. Moeller, B.J., et al., *Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules*. Cancer Cell, 2004. **5**(5): p. 429-41.
472. Unruh, A., et al., *The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy*. Oncogene, 2003. **22**(21): p. 3213-20.
473. Scheuermann, T.H., et al., *Hypoxia-inducible factors Per/ARNT/Sim domains: structure and function*. Methods Enzymol, 2007. **435**: p. 3-24.
474. Tanaka, T., et al., *The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3alpha gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction*. Biochem J, 2009. **424**(1): p. 143-51.
475. Gruber, M. and M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors, hypoxia, and tumor angiogenesis*. Curr Opin Hematol, 2006. **13**(3): p. 169-74.
476. Qing, G. and M.C. Simon, *Hypoxia inducible factor-2alpha: a critical mediator of aggressive tumor phenotypes*. Curr Opin Genet Dev, 2009. **19**(1): p. 60-6.
477. Wang, G.L. and G.L. Semenza, *General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4304-8.
478. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. J Biol Chem, 1996. **271**(51): p. 32529-37.
479. Vengellur, A., et al., *Gene expression profiling of the hypoxia signaling pathway in hypoxia-inducible factor 1alpha null mouse embryonic fibroblasts*. Gene Expr, 2003. **11**(3-4): p. 181-97.

480. Bellot, G., et al., *Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(10): p. 2570-81.
481. Dehne, N. and B. Brune, *HIF-1 in the inflammatory microenvironment*. Exp Cell Res, 2009. **315**(11): p. 1791-7.
482. Cramer, T., et al., *HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation*. Cell, 2003. **112**(5): p. 645-57.
483. Forsythe, J.A., et al., *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 4604-13.
484. Connolly, D.T., et al., *Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis*. J Clin Invest, 1989. **84**(5): p. 1470-8.
485. Eckle, T., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning*. Circulation, 2008. **118**(2): p. 166-75.
486. Shohet, R.V. and J.A. Garcia, *Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia*. J Mol Med, 2007. **85**(12): p. 1309-15.
487. Kim, H.A., R.I. Mahato, and M. Lee, *Hypoxia-specific gene expression for ischemic disease gene therapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(7-8): p. 614-22.
488. Harten, S.K., M. Ashcroft, and P.H. Maxwell, *Prolyl hydroxylase domain inhibitors: a route to HIF activation and neuroprotection*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(4): p. 459-80.
489. Bosco, M.C., et al., *The hypoxic synovial environment regulates expression of vascular endothelial growth factor and osteopontin in juvenile idiopathic arthritis*. J Rheumatol, 2009. **36**(6): p. 1318-29.
490. Giatromanolaki, A., et al., *Upregulated hypoxia inducible factor-1alpha and -2alpha pathway in rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(4): p. R193-201.
491. Higashida, T., et al., *Expression of hypoxia-inducible angiogenic proteins (hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and E26 transformation-specific-1) and plaque hemorrhage in human carotid atherosclerosis*. J Neurosurg, 2008. **109**(1): p. 83-91.

492. Vink, A., et al., *HIF-1 alpha expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages*. *Atherosclerosis*, 2007. **195**(2): p. e69-75.
493. Zhong, H., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases*. *Cancer Res*, 1999. **59**(22): p. 5830-5.
494. van de Sluis, B., et al., *COMMD1 disrupts HIF-1alpha/beta dimerization and inhibits human tumor cell invasion*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(6): p. 2119-30.
495. Bernardi, R., et al., *PML inhibits HIF-1alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR*. *Nature*, 2006. **442**(7104): p. 779-85.
496. Jung, C.R., et al., *E2-EPF UCP targets pVHL for degradation and associates with tumor growth and metastasis*. *Nat Med*, 2006. **12**(7): p. 809-16.
497. Isaacs, J.S., et al., *HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(2): p. 143-53.
498. Kurokawa, T., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible-factor 1alpha(HIF-1alpha) in oesophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(6): p. 1042-7.
499. Karhausen, J., et al., *Induction of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by late hypoxia limits HIF-1 expression*. *J Cell Biochem*, 2005. **95**(6): p. 1264-75.
500. Ginouves, A., et al., *PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIF1alpha and protects cells from necrosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(12): p. 4745-50.
501. Tan, M., et al., *SAG/ROC2/RBX2 is a HIF-1 target gene that promotes HIF-1 alpha ubiquitination and degradation*. *Oncogene*, 2008. **27**(10): p. 1404-11.
502. Berra, E., et al., *HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia*. *EMBO J*, 2003. **22**(16): p. 4082-90.
503. Hirota, K. and G.L. Semenza, *Regulation of hypoxia-inducible factor 1 by prolyl and asparaginyl hydroxylases*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **338**(1): p. 610-6.
504. Chan, D.A., et al., *Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(15): p. 6415-26.

505. Jaakkola, P., et al., *Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
506. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
507. Arany, Z., et al., *An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 12969-73.
508. Graven, K.K., et al., *Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1447**(2-3): p. 208-18.
509. Ebert, B.L., J.D. Firth, and P.J. Ratcliffe, *Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences*. J Biol Chem, 1995. **270**(49): p. 29083-9.
510. Chen, N., et al., *BCL-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1 $\{\alpha\}$* . J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 10004-12.
511. Kim, S.Y., et al., *Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor*. Immunology, 2010. **129**(4): p. 516-24.
512. Mwaikambo, B.R., et al., *Hypoxia up-regulates CD36 expression and function via hypoxia-inducible factor-1- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms*. J Biol Chem, 2009. **284**(39): p. 26695-707.
513. Staller, P., et al., *Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL*. Nature, 2003. **425**(6955): p. 307-11.
514. Zhang, R., et al., *Role of HIF-1 $\alpha$  in the regulation ACE and ACE2 expression in hypoxic human pulmonary artery smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(4): p. L631-40.
515. Richard, D.E., et al., *p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and enhance the transcriptional activity of HIF-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32631-7.
516. Flugel, D., et al., *Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and mediates its destabilization in a VHL-independent manner*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(9): p. 3253-65.



517. Cam, H., et al., *mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1alpha*. Mol Cell, 2010. **40**(4): p. 509-20.
518. Kuhlicke, J., et al., *Hypoxia inducible factor (HIF)-1 coordinates induction of Toll-like receptors TLR2 and TLR6 during hypoxia*. PLoS One, 2007. **2**(12): p. e1364.
519. Loh, S.A., et al., *SDF-1 alpha expression during wound healing in the aged is HIF dependent*. Plast Reconstr Surg, 2009. **123**(2 Suppl): p. 65S-75S.
520. Zhang, W., et al., *Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1beta (IL-1beta) in astrocyte cultures*. J Neuroimmunol, 2006. **174**(1-2): p. 63-73.
521. Tseng, W.P., et al., *Hypoxia induces BMP-2 expression via ILK, Akt, mTOR, and HIF-1 pathways in osteoblasts*. J Cell Physiol, 2010. **223**(3): p. 810-8.
522. Li, Y., et al., *Hypoxia induced CCR7 expression via HIF-1alpha and HIF-2alpha correlates with migration and invasion in lung cancer cells*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(4): p. 322-30.
523. Maxwell, P.J., et al., *HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells*. Oncogene, 2007. **26**(52): p. 7333-45.
524. Lin, S., et al., *Chemokine C-X-C motif receptor 6 contributes to cell migration during hypoxia*. Cancer Lett, 2009. **279**(1): p. 108-17.
525. Zhao, X.Y., et al., *Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells*. Carcinogenesis, 2010. **31**(8):1367-75.
526. Charron, C.E., et al., *Hypoxia-inducible factor 1alpha induces corticosteroid-insensitive inflammation via reduction of histone deacetylase-2 transcription*. J Biol Chem, 2009. **284**(52): p. 36047-54.
527. Kim, S.H., et al., *Human enhancer of filamentation 1 Is a mediator of hypoxia-inducible factor-1alpha-mediated migration in colorectal carcinoma cells*. Cancer Res, 2010. **70**(10): p. 4054-63.
528. Martorell, L., et al., *The hypoxia-inducible factor 1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells to hypoxia*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(21): p. 5828-42.
529. Kaidi, A., et al., *Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and*

- enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia.* Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6683-91.
530. Maxwell, P.H., et al., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.* Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
  531. Iyer, N.V., S.W. Leung, and G.L. Semenza, *The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation.* Genomics, 1998. **52**(2): p. 159-65.
  532. Luo, G., et al., *Molecular characterization of the murine Hif-1 alpha locus.* Gene Expr, 1997. **6**(5): p. 287-99.
  533. Minet, E., et al., *HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5'UTR.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(2): p. 534-40.
  534. Folpe, A.L., *MyoD1 and myogenin expression in human neoplasia: a review and update.* Adv Anat Pathol, 2002. **9**(3): p. 198-203.
  535. Sugiyama, H., *WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy.* Jpn J Clin Oncol, 2010. **40**(5): p. 377-87.
  536. Qiao, Q., et al., *NF-kappaB mediates aberrant activation of HIF-1 in malignant lymphoma.* Exp Hematol, 2010. **38**(12): p. 1199-208.
  537. Bonello, S., et al., *Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 755-61.
  538. Belaiba, R.S., et al., *Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells.* Mol Biol Cell, 2007. **18**(12): p. 4691-7.
  539. van Uden, P., N.S. Kenneth, and S. Rocha, *Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB.* Biochem J, 2008. **412**(3): p. 477-84.
  540. Rius, J., et al., *NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha.* Nature, 2008. **453**(7196): p. 807-11.
  541. Niu, G., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1alpha RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells.* Mol Cancer Res, 2008. **6**(7): p. 1099-105.

542. Sperandio, S., et al., *The transcription factor Egr1 regulates the HIF-1alpha gene during hypoxia*. Mol Carcinog, 2009. **48**(1): p. 38-44.
543. Patel, N. and V.K. Kalra, *Placenta growth factor-induced early growth response 1 (Egr-1) regulates hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in endothelial cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(27): p. 20570-9.
544. Walczak-Drzewiecka, A., et al., *HIF-1alpha is up-regulated in activated mast cells by a process that involves calcineurin and NFAT*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1665-72.
545. Gerber, S.A. and J.S. Pober, *IFN-alpha induces transcription of hypoxia-inducible factor-1alpha to inhibit proliferation of human endothelial cells*. J Immunol, 2008. **181**(2): p. 1052-62.
546. Rolfe, D.F. and G.C. Brown, *Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals*. Physiol Rev, 1997. **77**(3): p. 731-58.
547. Jackson, R.J., C.U. Hellen, and T.V. Pestova, *The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(2): p. 113-27.
548. Koritzinsky, M., et al., *Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control*. EMBO J, 2006. **25**(5): p. 1114-25.
549. Koumenis, C., et al., *Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(21): p. 7405-16.
550. Liu, L., et al., *Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 521-31.
551. Tinton, S.A. and P.M. Buc-Calderon, *Hypoxia increases the association of 4E-binding protein 1 with the initiation factor 4E in isolated rat hepatocytes*. FEBS Lett, 1999. **446**(1): p. 55-9.
552. Connolly, E., et al., *Hypoxia inhibits protein synthesis through a 4E-BP1 and elongation factor 2 kinase pathway controlled by mTOR and uncoupled in breast cancer cells*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(10): p. 3955-65.
553. Inoki, K., et al., *Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling*. Genes Dev, 2003. **17**(15): p. 1829-34.

554. Garami, A., et al., *Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2*. Mol Cell, 2003. **11**(6): p. 1457-66.
555. Tee, A.R., et al., *Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb*. Curr Biol, 2003. **13**(15): p. 1259-68.
556. Orlova, K.A. and P.B. Crino, *The tuberous sclerosis complex*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1184**: p. 87-105.
557. Li, Y., et al., *The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13663-71.
558. Hara, K., et al., *Regulation of eIF-4E BPI phosphorylation by mTOR*. J Biol Chem, 1997. **272**(42): p. 26457-63.
559. Sengupta, S., T.R. Peterson, and D.M. Sabatini, *Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 310-22.
560. Corradetti, M.N. and K.L. Guan, *Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR?* Oncogene, 2006. **25**(48): p. 6347-60.
561. Nellist, M., M.A. Goedbloed, and D.J. Halley, *Regulation of tuberous sclerosis complex (TSC) function by 14-3-3 proteins*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 3): p. 587-91.
562. Wouters, B.G. and M. Koritzinsky, *Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(11): p. 851-64.
563. DeYoung, M.P., et al., *Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling*. Genes Dev, 2008. **22**(2): p. 239-51.
564. Levy, N.S., et al., *Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR*. J Biol Chem, 1998. **273**(11): p. 6417-23.
565. Coles, L.S., et al., *A multi-protein complex containing cold shock domain (Y-box) and polypyrimidine tract binding proteins forms on the vascular endothelial growth factor mRNA. Potential role in mRNA stabilization*. Eur J Biochem, 2004. **271**(3): p. 648-60.
566. Hamilton, B.J., et al., *hnRNP A2 and hnRNP L bind the 3'UTR of glucose transporter 1 mRNA and exist as a complex in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(3): p. 646-51.

567. Masuda, K., K. Abdelmohsen, and M. Gorospe, *RNA-binding proteins implicated in the hypoxic response*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(9A): p. 2759-69.
568. Galban, S. and M. Gorospe, *Factors interacting with HIF-1alpha mRNA: novel therapeutic targets*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(33): p. 3853-60.
569. Hagele, S., et al., *Cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein (CPEB)1 and 2 bind to the HIF-1alpha mRNA 3'-UTR and modulate HIF-1alpha protein expression*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 235-46.
570. Keene, J.D., *RNA regulons: coordination of post-transcriptional events*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(7): p. 533-43.
571. Richter, J.D., *CPEB: a life in translation*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(6): p. 279-85.
572. Burgess, H.M. and N.K. Gray, *mRNA-specific regulation of translation by poly(A)-binding proteins*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(6): p. 1517-22.
573. Shin, D.H., et al., *Inhibitor of nuclear factor-kappaB alpha derepresses hypoxia-inducible factor-1 during moderate hypoxia by sequestering factor inhibiting hypoxia-inducible factor from hypoxia-inducible factor 1alpha*. FEBS J, 2009. **276**(13): p. 3470-80.
574. Carbia-Nagashima, A., et al., *RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia*. Cell, 2007. **131**(2): p. 309-23.
575. Young, R.M., et al., *Hypoxia-mediated selective mRNA translation by an internal ribosome entry site-independent mechanism*. J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16309-19.
576. Galban, S., et al., *RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(1): p. 93-107.
577. Triantafyllou, A., et al., *Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in HeLa cells by an iron-independent, but ROS-, PI-3K- and MAPK-dependent mechanism*. Free Radic Res, 2006. **40**(8): p. 847-56.
578. Chachami, G., et al., *Cobalt induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in airway smooth muscle cells by a reactive oxygen species- and PI3K-dependent mechanism*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(5): p. 544-51.

579. Nishi, K., et al., *LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(5): p. 983-95.
580. Sumbayev, V.V., *LPS-induced Toll-like receptor 4 signalling triggers cross-talk of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) and HIF-1alpha protein*. FEBS Lett, 2008. **582**(2): p. 319-26.
581. Blouin, C.C., et al., *Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Blood, 2004. **103**(3): p. 1124-30.
582. Pasanen, A., et al., *Hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha is subject to extensive alternative splicing in human tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but not HIF-2*. Int J Biochem Cell Biol. **42**(7): p. 1189-200.
583. Shin, Y.C., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IFN regulatory factor 3 stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha to induce vascular endothelial growth factor expression*. Cancer Res, 2008. **68**(6): p. 1751-9.
584. Kondo, S., et al., *EBV latent membrane protein 1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1alpha through Siah1-mediated down-regulation of prolyl hydroxylases 1 and 3 in nasopharyngeal epithelial cells*. Cancer Res, 2006. **66**(20): p. 9870-7.
585. Yoo, Y.G., et al., *The carboxy-terminus of the hepatitis B virus X protein is necessary and sufficient for the activation of hypoxia-inducible factor-1alpha*. FEBS Lett, 2004. **577**(1-2): p. 121-6.
586. Hong, S.W., et al., *HIF-1alpha-dependent gene expression program during the nucleic acid-triggered antiviral innate immune responses*. Mol Cells, 2009. **27**(2): p. 243-50.
587. Nicholas, S.A. and V.V. Sumbayev, *The involvement of hypoxia-inducible factor 1 alpha in Toll-like receptor 7/8-mediated inflammatory response*. Cell Res, 2009. **19**(8): p. 973-83.
588. Shatrov, V.A., et al., *Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) accumulation via redox-dependent mechanisms*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4847-9.
589. Xu, Q., et al., *Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways*. Oncogene, 2005. **24**(36): p. 5552-60.

590. Frede, S., et al., *The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation*. *Cancer Res*, 2005. **65**(11): p. 4690-7.
591. Zhou, J., T. Schmid, and B. Brune, *Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(6): p. 2216-25.
592. Page, E.L., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(1): p. 86-94.
593. Page, E.L., et al., *Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(50): p. 48403-9.
594. Laughner, E., et al., *HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(12): p. 3995-4004.
595. Treins, C., et al., *Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(31): p. 27975-81.
596. Lauzier, M.C., et al., *Differential regulation of hypoxia-inducible factor-1 through receptor tyrosine kinase transactivation in vascular smooth muscle cells*. *Endocrinology*, 2007. **148**(8): p. 4023-31.
597. Sheflin, L.G., A.P. Zou, and S.W. Spaulding, *Androgens regulate the binding of endogenous HuR to the AU-rich 3'UTRs of HIF-1alpha and EGF mRNA*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **322**(2): p. 644-51.
598. Bert, A.G., et al., *Assessing IRES activity in the HIF-1alpha and other cellular 5' UTRs*. *RNA*, 2006. **12**(6): p. 1074-83.
599. Lang, K.J., A. Kappel, and G.J. Goodall, *Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(5): p. 1792-801.
600. Schepens, B., et al., *The polypyrimidine tract-binding protein stimulates HIF-1alpha IRES-mediated translation during hypoxia*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(21): p. 6884-94.
601. Gilbert, W.V., *Alternative ways to think about cellular internal ribosome entry*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(38): p. 29033-8.

602. Lloyd-Jones, D., et al., *Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. Circulation, 2009. **119**(3): p. 480-6.
603. Prasad, D.S. and B.C. Das, *Physical inactivity: a cardiovascular risk factor*. Indian J Med Sci, 2009. **63**(1): p. 33-42.
604. Raupach, T., et al., *Secondhand smoke as an acute threat for the cardiovascular system: a change in paradigm*. Eur Heart J, 2006. **27**(4): p. 386-92.
605. Mann, J.I., *Diet and risk of coronary heart disease and type 2 diabetes*. Lancet, 2002. **360**(9335): p. 783-9.
606. He, F.J. and G.A. MacGregor, *A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes*. J Hum Hypertens, 2009. **23**(6): p. 363-84.
607. Lavie, C.J., R.V. Milani, and H.O. Ventura, *Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(21): p. 1925-32.
608. Ford, E.S., G. Zhao, and C. Li, *Pre-diabetes and the risk for cardiovascular disease: a systematic review of the evidence*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(13): p. 1310-7.
609. Gerich, J.E., *Type 2 diabetes mellitus is associated with multiple cardiometabolic risk factors*. Clin Cornerstone, 2007. **8**(3): p. 53-68.
610. Pieske, B. and R. Wachter, *Impact of diabetes and hypertension on the heart*. Curr Opin Cardiol, 2008. **23**(4): p. 340-9.
611. Messerli, F.H., B. Williams, and E. Ritz, *Essential hypertension*. Lancet, 2007. **370**(9587): p. 591-603.
612. Moons, A.H., M. Levi, and R.J. Peters, *Tissue factor and coronary artery disease*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(2): p. 313-25.
613. Toschi, V., et al., *Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques*. Circulation, 1997. **95**(3): p. 594-9.
614. Burke, A.P. and R. Virmani, *Pathophysiology of acute myocardial infarction*. Med Clin North Am, 2007. **91**(4): p. 553-72; ix.
615. Derdeyn, C.P., *Mechanisms of ischemic stroke secondary to large artery atherosclerotic disease*. Neuroimaging Clin N Am, 2007. **17**(3): p. 303-11, vii-viii.



616. Stary, H.C., et al., *A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Arterioscler Thromb, 1992. **12**(1): p. 120-34.
617. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1355-74.
618. Stary, H.C., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Arterioscler Thromb, 1994. **14**(5): p. 840-56.
619. Stary, H.C., *Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1177-8.
620. Virmani, R., et al., *Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1262-75.
621. Marieb, E.N., *Anatomie et physiologie humaines*. 3e éd. ed. 2005, Paris: Pearson Education. xxi, 1288, [8].
622. Kovanen, P.T., *Mast cells and degradation of pericellular and extracellular matrices: potential contributions to erosion, rupture and intraplaque haemorrhage of atherosclerotic plaques*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 5): p. 857-61.
623. Yilmaz, A., et al., *Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques*. Atherosclerosis, 2004. **176**(1): p. 101-10.
624. Roselaar, S.E., P.X. Kakkanathu, and A. Daugherty, *Lymphocyte populations in atherosclerotic lesions of apoE -/- and LDL receptor -/- mice. Decreasing density with disease progression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(8): p. 1013-8.
625. Zhou, X. and G.K. Hansson, *Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice*. Scand J Immunol, 1999. **50**(1): p. 25-30.
626. Galkina, E., et al., *Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent*. J Exp Med, 2006. **203**(5): p. 1273-82.

627. Stary, H.C., *Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries*. Basic Res Cardiol, 1994. **89 Suppl 1**: p. 17-32.
628. Franklin, B.A. and J.K. Kahn, *Delayed progression or regression of coronary atherosclerosis with intensive risk factor modification. Effects of diet, drugs, and exercise*. Sports Med, 1996. **22**(5): p. 306-20.
629. Hodis, H.N., *Reversibility of atherosclerosis--evolving perspectives from two arterial imaging clinical trials: the cholesterol lowering atherosclerosis regression study and the monitored atherosclerosis regression study*. J Cardiovasc Pharmacol, 1995. **25 Suppl 4**: p. S25-31.
630. Johnson, R.C., J.A. Leopold, and J. Loscalzo, *Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications*. Circ Res, 2006. **99**(10): p. 1044-59.
631. Bobik, A., *Transforming growth factor-betas and vascular disorders*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1712-20.
632. Yao, Y., et al., *Inhibition of Bone Morphogenetic Proteins Protects Against Atherosclerosis and Vascular Calcification*. Circ Res, 2010. **107**(4):485-94.
633. Collett, G.D. and A.E. Canfield, *Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification*. Circ Res, 2005. **96**(9): p. 930-8.
634. Virani, S.S. and C.M. Ballantyne, *How to identify patients with vulnerable plaques*. Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(10): p. 824-33.
635. Galkina, E. and K. Ley, *Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (\*)*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 165-97.
636. DeBakey, M.E., G.M. Lawrie, and D.H. Glaeser, *Patterns of atherosclerosis and their surgical significance*. Ann Surg, 1985. **201**(2): p. 115-31.
637. Frangos, S.G., V. Gahtan, and B. Sumpio, *Localization of atherosclerosis: role of hemodynamics*. Arch Surg, 1999. **134**(10): p. 1142-9.
638. VanderLaan, P.A., C.A. Reardon, and G.S. Getz, *Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 12-22.
639. Chiu, J.J., S. Usami, and S. Chien, *Vascular endothelial responses to altered shear stress: pathologic implications for atherosclerosis*. Ann Med, 2009. **41**(1): p. 19-28.

640. Dai, G., et al., *Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(41): p. 14871-6.
641. Chen, K.D., et al., *Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18393-400.
642. Jalali, S., et al., *Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(3): p. 1042-6.
643. Shyy, Y.J., et al., *Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4678-82.
644. Mullick, A.E., et al., *Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events*. J Exp Med, 2008. **205**(2): p. 373-83.
645. Dunzendorfer, S., H.K. Lee, and P.S. Tobias, *Flow-dependent regulation of endothelial Toll-like receptor 2 expression through inhibition of SP1 activity*. Circ Res, 2004. **95**(7): p. 684-91.
646. Yang, Q.W., et al., *Role of Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in monocyte-endothelial adhesion induced by low shear stress and ox-LDL*. Biorheology, 2005. **42**(3): p. 225-36.
647. De Keulenaer, G.W., et al., *Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase*. Circ Res, 1998. **82**(10): p. 1094-101.
648. Hwang, J., et al., *Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation*. Circ Res, 2003. **93**(12): p. 1225-32.
649. Hastings, N.E., et al., *Atherosclerosis-prone hemodynamics differentially regulates endothelial and smooth muscle cell phenotypes and promotes pro-inflammatory priming*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(6): p. C1824-33.
650. Nakashima, Y., et al., *Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(5): p. 1159-65.

651. Napoli, C., et al., *Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions.* J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2680-90.
652. Orr, A.W., et al., *The subendothelial extracellular matrix modulates NF-kappaB activation by flow: a potential role in atherosclerosis.* J Cell Biol, 2005. **169**(1): p. 191-202.
653. Williams, K.J. and I. Tabas, *The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(5): p. 551-61.
654. Khalil, M.F., W.D. Wagner, and I.J. Goldberg, *Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(12): p. 2211-8.
655. Orr, A.W., et al., *Matrix-specific p21-activated kinase activation regulates vascular permeability in atherogenesis.* J Cell Biol, 2007. **176**(5): p. 719-27.
656. Orr, A.W., et al., *p21-activated kinase signaling regulates oxidant-dependent NF-kappa B activation by flow.* Circ Res, 2008. **103**(6): p. 671-9.
657. Hahn, C., et al., *The subendothelial extracellular matrix modulates JNK activation by flow.* Circ Res, 2009. **104**(8): p. 995-1003.
658. Simionescu, M., *Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(2): p. 266-74.
659. Ogunrinade, O., G.T. Kameya, and G.A. Truskey, *Effect of fluid shear stress on the permeability of the arterial endothelium.* Ann Biomed Eng, 2002. **30**(4): p. 430-46.
660. Stockton, R.A., E. Schaefer, and M.A. Schwartz, *p21-activated kinase regulates endothelial permeability through modulation of contractility.* J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46621-30.
661. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
662. Ross, R., J. Glomset, and L. Harker, *Response to injury and atherogenesis.* Am J Pathol, 1977. **86**(3): p. 675-84.
663. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts).* N Engl J Med, 1976. **295**(7): p. 369-77.

664. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(8): p. 420-5.
665. Chen, Y.L., et al., *Relationship between endothelial cell turnover and permeability to horseradish peroxidase*. Atherosclerosis, 1997. **133**(1): p. 7-14.
666. Frei, B., R. Stocker, and B.N. Ames, *Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(24): p. 9748-52.
667. Skalen, K., et al., *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis*. Nature, 2002. **417**(6890): p. 750-4.
668. Williams, K.J. and I. Tabas, *Lipoprotein retention--and clues for atheroma regression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(8): p. 1536-40.
669. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
670. Kato, R., et al., *Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(1): p. 33-9.
671. Reiss, A.B., K. Anwar, and P. Wirkowski, *Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) in atherogenesis: a brief review*. Curr Med Chem, 2009. **16**(21): p. 2641-52.
672. Moore, K.J., et al., *Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2192-201.
673. Kume, N., et al., *Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **902**: p. 323-7.
674. Prochnau, D., et al., *Induced expression of lectin-like oxidized ldl receptor-1 in vascular smooth muscle cells following Chlamydia pneumoniae infection and its down-regulation by fluvastatin*. Acta Microbiol Immunol Hung, 2010. **57**(2): p. 147-55.
675. Kosaka, H., et al., *Induction of LOX-1 and iNOS expressions by ischemia-reperfusion of rat kidney and the opposing effect of L-arginine*. FASEB J, 2003. **17**(6): p. 636-43.
676. Hag, A.M., et al., *Regional gene expression of LOX-1, VCAM-1, and ICAM-1 in aorta of HIV-1 transgenic rats*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8170.

677. Kume, N., et al., *Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells*. *Circ Res*, 1998. **83**(3): p. 322-7.
678. Chen, J., et al., *Molecular dissection of angiotensin II-activated human LOX-1 promoter*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(5): p. 1163-8.
679. Ogura, S., et al., *Lox-1: the multifunctional receptor underlying cardiovascular dysfunction*. *Circ J*, 2009. **73**(11): p. 1993-9.
680. Korporaal, S.J., et al., *Platelet activation by oxidized low density lipoprotein is mediated by CD36 and scavenger receptor-A*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(11): p. 2476-83.
681. Maziere, C., et al., *Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcription factor NF kappa B in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells*. *Biochem Mol Biol Int*, 1996. **39**(6): p. 1201-7.
682. Janabi, M., et al., *Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(8): p. 1953-60.
683. Ares, M.P., et al., *Oxidized LDL induces transcription factor activator protein-1 but inhibits activation of nuclear factor-kappa B in human vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(10): p. 1584-90.
684. Maziere, C., et al., *Oxidized LDL activates STAT1 and STAT3 transcription factors: possible involvement of reactive oxygen species*. *FEBS Lett*, 1999. **448**(1): p. 49-52.
685. Maziere, C. and J.C. Maziere, *Activation of transcription factors and gene expression by oxidized low-density lipoprotein*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **46**(2): p. 127-37.
686. Rangaswamy, S., et al., *Exogenous oxidized low-density lipoprotein injures and alters the barrier function of endothelium in rats in vivo*. *Circ Res*, 1997. **80**(1): p. 37-44.
687. Gardner, G., et al., *Modified LDL-mediated increases in endothelial layer permeability are attenuated with 17 beta-estradiol*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(4): p. 854-61.
688. Bobryshev, Y.V., *Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis*. *Micron*, 2006. **37**(3): p. 208-22.

689. Thorp, E. and I. Tabas, *Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(5): p. 1089-95.
690. Moreno, P.R., *Vulnerable plaque: definition, diagnosis, and treatment*. Cardiol Clin, 2010. **28**(1): p. 1-30.
691. Loree, H.M., et al., *Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels*. Circ Res, 1992. **71**(4): p. 850-8.
692. Burke, A.P., et al., *Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly*. N Engl J Med, 1997. **336**(18): p. 1276-82.
693. Moreno, P.R., et al., *Intimomedial interface damage and adventitial inflammation is increased beneath disrupted atherosclerosis in the aorta: implications for plaque vulnerability*. Circulation, 2002. **105**(21): p. 2504-11.
694. Davies, M.J., *The pathophysiology of acute coronary syndromes*. Heart, 2000. **83**(3): p. 361-6.
695. Felton, C.V., et al., *Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(7): p. 1337-45.
696. Moreno, P.R., et al., *Macrophages, smooth muscle cells, and tissue factor in unstable angina. Implications for cell-mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes*. Circulation, 1996. **94**(12): p. 3090-7.
697. Waxman, S., F. Ishibashi, and J.E. Muller, *Detection and treatment of vulnerable plaques and vulnerable patients: novel approaches to prevention of coronary events*. Circulation, 2006. **114**(22): p. 2390-411.
698. Varnava, A.M., P.G. Mills, and M.J. Davies, *Relationship between coronary artery remodeling and plaque vulnerability*. Circulation, 2002. **105**(8): p. 939-43.
699. Schoenhagen, P., et al., *Extent and direction of arterial remodeling in stable versus unstable coronary syndromes : an intravascular ultrasound study*. Circulation, 2000. **101**(6): p. 598-603.
700. de Boer, O.J., et al., *Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization?* Cardiovasc Res, 1999. **41**(2): p. 443-9.
701. Halvorsen, B., et al., *Atherosclerotic plaque stability--what determines the fate of a plaque?* Prog Cardiovasc Dis, 2008. **51**(3): p. 183-94.

702. Segers, D., et al., *Gelatinolytic activity in atherosclerotic plaques is highly localized and is associated with both macrophages and smooth muscle cells in vivo*. *Circulation*, 2007. **115**(5): p. 609-16.
703. Yan, C. and D.D. Boyd, *Regulation of matrix metalloproteinase gene expression*. *J Cell Physiol*, 2007. **211**(1): p. 19-26.
704. Fanjul-Fernandez, M., et al., *Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1803**(1): p. 3-19.
705. Lu, Y. and L.M. Wahl, *Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes*. *J Immunol*, 2005. **175**(8): p. 5423-9.
706. Browatzki, M., et al., *Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner*. *J Vasc Res*, 2005. **42**(5): p. 415-23.
707. Moon, S.K., B.Y. Cha, and C.H. Kim, *ERK1/2 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway*. *J Cell Physiol*, 2004. **198**(3): p. 417-27.
708. Yoo, H.G., et al., *IL-1beta induces MMP-9 via reactive oxygen species and NF-kappaB in murine macrophage RAW 264.7 cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **298**(2): p. 251-6.
709. Huang, Y., M. Mironova, and M.F. Lopes-Virella, *Oxidized LDL stimulates matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(11): p. 2640-7.
710. Xu, X.P., et al., *Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages*. *Circulation*, 1999. **99**(8): p. 993-8.
711. Tabas, I., *Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(11): p. 2255-64.
712. Zernecke, A., et al., *Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis*. *Circ Res*, 2008. **102**(2): p. 209-17.



713. Galligan, C. and T. Yoshimura, *Phenotypic and functional changes of cytokine-activated neutrophils*. Chem Immunol Allergy, 2003. **83**: p. 24-44.
714. Soehnlein, O. and C. Weber, *Myeloid cells in atherosclerosis: initiators and decision shapers*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(1): p. 35-47.
715. Sugiyama, S., et al., *Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(7): p. 1309-14.
716. Brennan, M.L., et al., *Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain*. N Engl J Med, 2003. **349**(17): p. 1595-604.
717. Fuster, V., et al., *Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(6): p. 937-54.
718. Farb, A., et al., *Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death*. Circulation, 1996. **93**(7): p. 1354-63.
719. Aukrust, P., et al., *The complex role of T-cell-based immunity in atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2008. **10**(3): p. 236-43.
720. Gupta, S., et al., *IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice*. J Clin Invest, 1997. **99**(11): p. 2752-61.
721. Tellides, G., et al., *Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes*. Nature, 2000. **403**(6766): p. 207-11.
722. Koga, M., et al., *Inhibition of progression and stabilization of plaques by postnatal interferon-gamma function blocking in ApoE-knockout mice*. Circ Res, 2007. **101**(4): p. 348-56.
723. Libby, P., et al., *Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque*. J Cardiovasc Pharmacol, 1995. **25 Suppl 2**: p. S9-12.
724. Bobryshev, Y.V. and R.S. Lord, *Mapping of vascular dendritic cells in atherosclerotic arteries suggests their involvement in local immune-inflammatory reactions*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(3): p. 799-810.
725. Han, J.W., et al., *Vessel wall-embedded dendritic cells induce T-cell autoreactivity and initiate vascular inflammation*. Circ Res, 2008. **102**(5): p. 546-53.

726. Stemme, S., L. Rymo, and G.K. Hansson, *Polyclonal origin of T lymphocytes in human atherosclerotic plaques*. Lab Invest, 1991. **65**(6): p. 654-60.
727. Niessner, A. and C.M. Weyand, *Dendritic cells in atherosclerotic disease*. Clin Immunol, 2010. **134**(1): p. 25-32.
728. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1219-26.
729. Moreno, P.R., et al., *Neovascularization in human atherosclerosis*. Circulation, 2006. **113**(18): p. 2245-52.
730. Jantsch, J., et al., *Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4697-705.
731. Burke, B., et al., *Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy*. Am J Pathol, 2003. **163**(4): p. 1233-43.
732. O'Brien, K.D., et al., *Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content*. Circulation, 1996. **93**(4): p. 672-82.
733. Lobanova, E.M. and A.D. Tahanovich, *Hydrogen peroxide metabolism in alveolar macrophages after exposure to hypoxia and heat*. Physiol Res, 2006. **55**(5): p. 569-75.
734. Lattimore, J.D., et al., *Repetitive hypoxia increases lipid loading in human macrophages-a potentially atherogenic effect*. Atherosclerosis, 2005. **179**(2): p. 255-9.
735. Rydberg, E.K., et al., *Hypoxia increases LDL oxidation and expression of 15-lipoxygenase-2 in human macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(11): p. 2040-5.
736. Bostrom, P., et al., *Hypoxia converts human macrophages into triglyceride-loaded foam cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1871-6.
737. Doran, A.C., N. Meller, and C.A. McNamara, *Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 812-9.
738. Rudijanto, A., *The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis*. Acta Med Indones, 2007. **39**(2): p. 86-93.

739. Jin, Z.G., et al., *Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase*. *Circ Res*, 2003. **93**(4): p. 354-63.
740. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
741. Albina, J.E. and J.S. Reichner, *Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis*. *Cancer Metastasis Rev*, 1998. **17**(1): p. 39-53.
742. Fang, F.C., *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies*. *Nat Rev Microbiol*, 2004. **2**(10): p. 820-32.
743. Cauwels, A., *Nitric oxide in shock*. *Kidney Int*, 2007. **72**(5): p. 557-65.
744. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. *Nature*, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
745. Rapoport, R.M., M.B. Draznin, and F. Murad, *Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation*. *Nature*, 1983. **306**(5939): p. 174-6.
746. Rembold, C.M., *Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle*. *Hypertension*, 1992. **20**(2): p. 129-37.
747. Walter, P. and E. Bassenge, *Effect of angiotensin on vascular smooth muscles*. *Pflugers Arch*, 1969. **307**(1): p. 70-82.
748. Yanagisawa, M., et al., *A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca<sup>2+</sup> channels*. *J Hypertens Suppl*, 1988. **6**(4): p. S188-91.
749. Ellis, E.F., et al., *Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: evidence that it is thromboxane A<sub>2</sub>*. *Science*, 1976. **193**(4258): p. 1135-7.
750. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. *Nature*, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
751. Tomanek, R.J., *Formation of the coronary vasculature during development*. *Angiogenesis*, 2005. **8**(3): p. 273-84.
752. Caplice, N.M. and B. Doyle, *Vascular progenitor cells: origin and mechanisms of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis*. *Stem Cells Dev*, 2005. **14**(2): p. 122-39.

753. Clowes, A.W. and S.M. Schwartz, *Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery*. Circ Res, 1985. **56**(1): p. 139-45.
754. Sata, M., et al., *Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis*. Nat Med, 2002. **8**(4): p. 403-9.
755. Caplice, N.M., et al., *Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4754-9.
756. Bentzon, J.F., et al., *Smooth muscle cells in atherosclerosis originate from the local vessel wall and not circulating progenitor cells in ApoE knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(12): p. 2696-702.
757. Bentzon, J.F., et al., *Smooth muscle cells healing atherosclerotic plaque disruptions are of local, not blood, origin in apolipoprotein E knockout mice*. Circulation, 2007. **116**(18): p. 2053-61.
758. Torsney, E., et al., *Characterisation of progenitor cells in human atherosclerotic vessels*. Atherosclerosis, 2007. **191**(2): p. 259-64.
759. Orlandi, A., et al., *Stem cell marker expression and proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells*. Cell Cycle, 2008. **7**(24): p. 3889-97.
760. Arora, P.D. and C.A. McCulloch, *Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts*. J Cell Physiol, 1994. **159**(1): p. 161-75.
761. Sartore, S., et al., *Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant*. Circ Res, 2001. **89**(12): p. 1111-21.
762. Wilcox, J.N., et al., *The role of the adventitia in the arterial response to angioplasty: the effect of intravascular radiation*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **36**(4): p. 789-96.
763. Shi, Y., et al., *Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries*. Circulation, 1996. **94**(7): p. 1655-64.
764. Scott, N.A., et al., *Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries*. Circulation, 1996. **93**(12): p. 2178-87.
765. Maiellaro, K. and W.R. Taylor, *The role of the adventitia in vascular inflammation*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(4): p. 640-8.

766. Benditt, E.P. and J.M. Benditt, *Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(6): p. 1753-6.
767. Chung, I.M., S.M. Schwartz, and C.E. Murry, *Clonal architecture of normal and atherosclerotic aorta: implications for atherogenesis and vascular development*. Am J Pathol, 1998. **152**(4): p. 913-23.
768. Hirschi, K.K. and M.W. Majesky, *Smooth muscle stem cells*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **276**(1): p. 22-33.
769. Chamley-Campbell, J., G.R. Campbell, and R. Ross, *The smooth muscle cell in culture*. Physiol Rev, 1979. **59**(1): p. 1-61.
770. Arakawa, E., et al., *L-ascorbic acid stimulates expression of smooth muscle-specific markers in smooth muscle cells both in vitro and in vivo*. J Cardiovasc Pharmacol, 2003. **42**(6): p. 745-51.
771. Martin, K.A., et al., *The mTOR/p70 S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(3): p. C507-17.
772. Wang, C.C., I. Gurevich, and B. Draznin, *Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways*. Diabetes, 2003. **52**(10): p. 2562-9.
773. Hayashi, K., et al., *Differentiated phenotype of smooth muscle cells depends on signaling pathways through insulin-like growth factors and phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(44): p. 28860-7.
774. Powell, R.J., et al., *Endothelial cell modulation of smooth muscle cell morphology and organizational growth pattern*. Ann Vasc Surg, 1996. **10**(1): p. 4-10.
775. Powell, R.J., et al., *Endothelial cell effect on smooth muscle cell collagen synthesis*. J Surg Res, 1997. **69**(1): p. 113-8.
776. Wang, L., et al., *Cartilage oligomeric matrix protein maintains the contractile phenotype of vascular smooth muscle cells by interacting with alpha(7)beta(1) integrin*. Circ Res, 2010. **106**(3): p. 514-25.
777. Sobue, K., K. Hayashi, and W. Nishida, *Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation*. Mol Cell Biochem, 1999. **190**(1-2): p. 105-18.
778. Rzucidlo, E.M., K.A. Martin, and R.J. Powell, *Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation*. J Vasc Surg, 2007. **45 Suppl A**: p. A25-32.

779. Cheng, Y., et al., *MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation*. Circ Res, 2009. **105**(2): p. 158-66.
780. Dong, L.H., et al., *Blockade of the Ras-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in smooth muscle 22 alpha-mediated suppression of vascular smooth muscle cell proliferation and neointima hyperplasia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(4): p. 683-91.
781. Bochaton-Piallat, M.L. and G. Gabbiani, *Modulation of smooth muscle cell proliferation and migration: role of smooth muscle cell heterogeneity*. Handb Exp Pharmacol, 2005(170): p. 645-63.
782. Yan, Z.Q., et al., *Augmented expression of inducible NO synthase in vascular smooth muscle cells during aging is associated with enhanced NF-kappaB activation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(12): p. 2854-62.
783. Villaschi, S., R.F. Nicosia, and M.R. Smith, *Isolation of a morphologically and functionally distinct smooth muscle cell type from the intimal aspect of the normal rat aorta. Evidence for smooth muscle cell heterogeneity*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1994. **30A**(9): p. 589-95.
784. Li, S., et al., *Innate diversity of adult human arterial smooth muscle cells: cloning of distinct subtypes from the internal thoracic artery*. Circ Res, 2001. **89**(6): p. 517-25.
785. Bochaton-Piallat, M.L., et al., *Cultured aortic smooth muscle cells from newborn and adult rats show distinct cytoskeletal features*. Differentiation, 1992. **49**(3): p. 175-85.
786. Cook, C.L., et al., *Developmentally timed expression of an embryonic growth phenotype in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1994. **74**(2): p. 189-96.
787. McCaffrey, T.A., et al., *Aging and arteriosclerosis. The increased proliferation of arterial smooth muscle cells isolated from old rats is associated with increased platelet-derived growth factor-like activity*. J Exp Med, 1988. **167**(1): p. 163-74.
788. Hultgardh-Nilsson, A., et al., *Differences in growth factor response in smooth muscle cells isolated from adult and neonatal rat arteries*. Differentiation, 1991. **47**(2): p. 99-105.
789. Bochaton-Piallat, M.L., et al., *Age influences the replicative activity and the differentiation features of cultured rat aortic smooth muscle cell populations and clones*. Arterioscler Thromb, 1993. **13**(10): p. 1449-55.

790. Hao, H., et al., *Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(7): p. 1093-9.
791. Martinez-Gonzalez, J., et al., *Heterogeneity of smooth muscle cells in advanced human atherosclerotic plaques: intimal smooth muscle cells expressing a fibroblast surface protein are highly activated by platelet-released products*. *Eur J Clin Invest*, 2001. **31**(11): p. 939-49.
792. Lehti, K., et al., *MT1-MMP promotes vascular smooth muscle dedifferentiation through LRP1 processing*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 1): p. 126-35.
793. Hayashi, K., et al., *Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids*. *Circ Res*, 2001. **89**(3): p. 251-8.
794. Zhang, C., et al., *Lysophosphatidic acid induces neointima formation through PPARgamma activation*. *J Exp Med*, 2004. **199**(6): p. 763-74.
795. Clement, N., et al., *PGE2 amplifies the effects of IL-1beta on vascular smooth muscle cell de-differentiation: a consequence of the versatility of PGE2 receptors 3 due to the emerging expression of adenylyl cyclase 8*. *J Cell Physiol*, 2006. **208**(3): p. 495-505.
796. Pidkovka, N.A., et al., *Oxidized phospholipids induce phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro*. *Circ Res*, 2007. **101**(8): p. 792-801.
797. Su, B., et al., *Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation*. *Circ Res*, 2001. **89**(1): p. 39-46.
798. Takahashi, M., et al., *Epiregulin as a major autocrine/paracrine factor released from ERK- and p38MAPK-activated vascular smooth muscle cells*. *Circulation*, 2003. **108**(20): p. 2524-9.
799. Li, Y., W. Lu, and G. Bu, *Essential role of the low density lipoprotein receptor-related protein in vascular smooth muscle cell migration*. *FEBS Lett*, 2003. **555**(2): p. 346-50.
800. Aramaki, Y., et al., *Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) acts as a receptor for remnant-like lipoprotein particles (RLPs) and mediates RLP-induced migration of vascular smooth muscle cells*. *Atherosclerosis*, 2008. **198**(2): p. 272-9.
801. Rong, J.X., et al., *Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(23): p. 13531-6.

802. Klouche, M., et al., *Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation.* Circulation, 2000. **101**(15): p. 1799-805.
803. Braun, M., et al., *Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells.* Cardiovasc Res, 1999. **41**(2): p. 395-401.
804. O'Brien, K.D., et al., *Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis.* J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 945-51.
805. Cai, Q., L. Lanting, and R. Natarajan, *Growth factors induce monocyte binding to vascular smooth muscle cells: implications for monocyte retention in atherosclerosis.* Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(3): p. C707-14.
806. Ang, A.H., et al., *Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype.* Biochem J, 1990. **265**(2): p. 461-9.
807. Bond, M., et al., *Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3 and -9 production by vascular smooth muscle cells.* Cardiovasc Res, 2001. **50**(3): p. 556-65.
808. Rodel, J., et al., *Increased production of matrix metalloproteinases 1 and 3 by smooth muscle cells upon infection with Chlamydia pneumoniae.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. **38**(2): p. 159-64.
809. Johnson, C. and Z.S. Galis, *Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(1): p. 54-60.
810. Brotman, D.J., et al., *In search of fewer independent risk factors.* Arch Intern Med, 2005. **165**(2): p. 138-45.
811. Marinou, K., et al., *Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification.* Int J Cardiol, 2010. **138**(1): p. 3-8.
812. Labreuche, J., P.J. Touboul, and P. Amarenco, *Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review of the epidemiological studies.* Atherosclerosis, 2009. **203**(2): p. 331-45.
813. Nakagami, H., et al., *Endothelial dysfunction in hyperglycemia as a trigger of atherosclerosis.* Curr Diabetes Rev, 2005. **1**(1): p. 59-63.
814. Agmon, Y., et al., *Independent association of high blood pressure and aortic atherosclerosis: A population-based study.* Circulation, 2000. **102**(17): p. 2087-93.



815. Alberti, K.G., et al., *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity*. *Circulation*, 2009. **120**(16): p. 1640-5.
816. Wittteman, J.C., et al., *Cigarette smoking and the development and progression of aortic atherosclerosis. A 9-year population-based follow-up study in women*. *Circulation*, 1993. **88**(5 Pt 1): p. 2156-62.
817. Lilly, L.S. and Harvard Medical School, *Pathophysiology of heart disease : a collaborative project of medical students and faculty*. 3rd ed. 2003, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xiii, 445.
818. Basso, N. and N.A. Terragno, *History about the discovery of the renin-angiotensin system*. *Hypertension*, 2001. **38**(6): p. 1246-9.
819. Reid, I.A., B.J. Morris, and W.F. Ganong, *The renin-angiotensin system*. *Annu Rev Physiol*, 1978. **40**: p. 377-410.
820. Valles, P., J. Wysocki, and D. Batlle, *Angiotensin II and renal tubular ion transport*. *ScientificWorldJournal*, 2005. **5**: p. 680-90.
821. Schluter, K.D. and S. Wenzel, *Angiotensin II: a hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks*. *Pharmacol Ther*, 2008. **119**(3): p. 311-25.
822. Rosenkranz, S., *TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling*. *Cardiovasc Res*, 2004. **63**(3): p. 423-32.
823. Androulakis, E.S., et al., *Essential hypertension: is there a role for inflammatory mechanisms?* *Cardiol Rev*, 2009. **17**(5): p. 216-21.
824. Brasier, A.R., A. Recinos, 3rd, and M.S. Eledrisi, *Vascular inflammation and the renin-angiotensin system*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(8): p. 1257-66.
825. Castrop, H., et al., *Physiology of kidney renin*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(2): p. 607-73.
826. Klett, C., et al., *Regulation of hepatic angiotensinogen synthesis and secretion by steroid hormones*. *Endocrinology*, 1992. **130**(6): p. 3660-8.
827. Brasier, A.R., J. Li, and K.A. Wimbish, *Tumor necrosis factor activates angiotensinogen gene expression by the Rel A transactivator*. *Hypertension*, 1996. **27**(4): p. 1009-17.

828. Sherman, C.T. and A.R. Brasier, *Role of signal transducers and activators of transcription 1 and -3 in inducible regulation of the human angiotensinogen gene by interleukin-6*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(3): p. 441-57.
829. Li, J. and A.R. Brasier, *Angiotensinogen gene activation by angiotensin II is mediated by the rel A (nuclear factor-kappaB p65) transcription factor: one mechanism for the renin angiotensin system positive feedback loop in hepatocytes*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(3): p. 252-64.
830. Jain, S., et al., *Upregulation of human angiotensinogen (AGT) gene transcription by interferon-gamma: involvement of the STAT1-binding motif in the AGT promoter*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1759**(7): p. 340-7.
831. Soden, M., et al., *Angiotensinogen: an acute-phase protein?* Hypertension, 1994. **23**(1 Suppl): p. 1126-30.
832. Brasier, A.R. and J. Li, *Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription*. Hypertension, 1996. **27**(3 Pt 2): p. 465-75.
833. Kang, N., et al., *Reduced hypertension-induced end-organ damage in mice lacking cardiac and renal angiotensinogen synthesis*. J Mol Med, 2002. **80**(6): p. 359-66.
834. Thatcher, S., et al., *The adipose renin-angiotensin system: role in cardiovascular disease*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **302**(2): p. 111-7.
835. Bader, M., *Role of the local renin-angiotensin system in cardiac damage: a minireview focussing on transgenic animal models*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(11): p. 1455-62.
836. Leung, P.S., *The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas*. J Physiol, 2007. **580**(Pt 1): p. 31-7.
837. Kaschina, E., et al., *Transition from atherosclerosis to aortic aneurysm in humans coincides with an increased expression of RAS components*. Atherosclerosis, 2009. **205**(2): p. 396-403.
838. Neo, J.H., et al., *Changes in the renin angiotensin system during the development of colorectal cancer liver metastases*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 134.
839. Ino, K., et al., *Manipulating the angiotensin system--new approaches to the treatment of solid tumours*. Expert Opin Biol Ther, 2006. **6**(3): p. 243-55.
840. Fyhrquist, F. and O. Saijonmaa, *Renin-angiotensin system revisited*. J Intern Med, 2008. **264**(3): p. 224-36.

841. Stragier, B., et al., *Involvement of insulin-regulated aminopeptidase in the effects of the renin-angiotensin fragment angiotensin IV: a review*. Heart Fail Rev, 2008. **13**(3): p. 321-37.
842. Ondetti, M.A., B. Rubin, and D.W. Cushman, *Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents*. Science, 1977. **196**(4288): p. 441-4.
843. Timmermans, P.B., et al., *Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists*. Pharmacol Rev, 1993. **45**(2): p. 205-51.
844. Gammelgaard, I., S. Wamberg, and P. Bie, *Systemic effects of angiotensin III in conscious dogs during acute double blockade of the renin-angiotensin-aldosterone-system*. Acta Physiol (Oxf), 2006. **188**(2): p. 129-38.
845. Urata, H., et al., *Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart*. J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1269-81.
846. Kuba, K., et al., *A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury*. Nat Med, 2005. **11**(8): p. 875-9.
847. Santos, R.A., et al., *Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8258-63.
848. Nguyen, G. and A. Contrepas, *Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor*. Curr Opin Pharmacol, 2008. **8**(2): p. 127-32.
849. Nussberger, J., et al., *Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor Aliskiren (SPP100): comparison with enalapril*. Hypertension, 2002. **39**(1): p. E1-8.
850. Chaudhary, K., R. Nistala, and A. Whaley-Connell, *Is there a future for direct renin inhibitors?* Expert Opin Investig Drugs, 2010. **19**(5): p. 653-61.
851. Corry, D.B., et al., *Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin-angiotensin system*. J Hypertens, 2008. **26**(2): p. 269-75.
852. Yu, M.A., et al., *Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction*. J Hypertens, 2010. **28**(6): p. 1234-42.
853. Jurewicz, M., et al., *Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1093-102.

854. Tuck, M.L., et al., *Insulin stimulates endogenous angiotensin II production via a mitogen-activated protein kinase pathway in vascular smooth muscle cells*. J Hypertens, 2004. **22**(9): p. 1779-85.
855. Barrett, J.D., et al., *Erythropoietin upregulates angiotensin receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells*. J Hypertens, 1998. **16**(12 Pt 1): p. 1749-57.
856. Abdul-Hafez, A., R. Shu, and B.D. Uhal, *JunD and HIF-1alpha mediate transcriptional activation of angiotensinogen by TGF-beta1 in human lung fibroblasts*. FASEB J, 2009. **23**(6): p. 1655-62.
857. Xiao, F., J.R. Puddefoot, and G.P. Vinson, *The expression of renin and the formation of angiotensin II in bovine aortic endothelial cells*. J Endocrinol, 2000. **164**(2): p. 207-14.
858. Sakoda, M., et al., *(Pro)renin receptor-mediated activation of mitogen-activated protein kinases in human vascular smooth muscle cells*. Hypertens Res, 2007. **30**(11): p. 1139-46.
859. Uraoka, M., et al., *Prorenin induces ERK activation in endothelial cells to enhance neovascularization independently of the renin-angiotensin system*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(4): p. 1202-7.
860. Sugiyama, T., et al., *Aldosterone induces angiotensin converting enzyme gene expression via a JAK2-dependent pathway in rat endothelial cells*. Endocrinology, 2005. **146**(9): p. 3900-6.
861. Krick, S., et al., *Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system*. FASEB J, 2005. **19**(7): p. 857-9.
862. Okamura, A., et al., *Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages*. J Hypertens, 1999. **17**(4): p. 537-45.
863. Danilov, S.M., et al., *Angiotensin-converting enzyme (CD143) is abundantly expressed by dendritic cells and discriminates human monocyte-derived dendritic cells from acute myeloid leukemia-derived dendritic cells*. Exp Hematol, 2003. **31**(12): p. 1301-9.
864. Leskinen, M.J., et al., *Mast cell chymase induces smooth muscle cell apoptosis by disrupting NF-kappaB-mediated survival signaling*. Exp Cell Res, 2006. **312**(8): p. 1289-98.

865. Koka, V., et al., *Advanced glycation end products activate a chymase-dependent angiotensin II-generating pathway in diabetic complications*. *Circulation*, 2006. **113**(10): p. 1353-60.
866. Wassmann, S., et al., *Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type I receptor*. *Circ Res*, 2004. **94**(4): p. 534-41.
867. Pueyo, M.E., N. N'Diaye, and J.B. Michel, *Angiotensin II-elicited signal transduction via AT1 receptors in endothelial cells*. *Br J Pharmacol*, 1996. **118**(1): p. 79-84.
868. Burnier, M., et al., *Effect of endotoxin on the angiotensin II receptor in cultured vascular smooth muscle cells*. *Br J Pharmacol*, 1995. **116**(5): p. 2524-30.
869. Lavrentyev, E.N., A.M. Estes, and K.U. Malik, *Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 2007. **101**(5): p. 455-64.
870. Gagliardi, A.C., M.H. Miname, and R.D. Santos, *Uric acid: A marker of increased cardiovascular risk*. *Atherosclerosis*, 2009. **202**(1): p. 11-7.
871. Felici, C., et al., *Purine catabolism in advanced carotid artery plaque*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2006. **25**(9-11): p. 1291-4.
872. Li, X.C. and J.L. Zhuo, *Intracellular ANG II directly induces in vitro transcription of TGF-beta1, MCP-1, and NHE-3 mRNAs in isolated rat renal cortical nuclei via activation of nuclear AT1a receptors*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. **294**(4): p. C1034-45.
873. Tadevosyan, A., et al., *Nuclear-delimited Angiotensin Receptor-mediated Signaling Regulates Cardiomyocyte Gene Expression*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(29): p. 22338-49.
874. Baker, K.M., et al., *Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy*. *Regul Pept*, 2004. **120**(1-3): p. 5-13.
875. Lucero, H.A., et al., *Cell signaling, internalization, and nuclear localization of the angiotensin converting enzyme in smooth muscle and endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(8): p. 5555-68.
876. Mukoyama, M., et al., *Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(33): p. 24539-42.

877. Jones, E.S., et al., *AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease*. Pharmacol Ther, 2008. **120**(3): p. 292-316.
878. AbdAlla, S., et al., *The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 39721-6.
879. Gasc, J.M., et al., *Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study*. Hypertension, 1994. **24**(5): p. 531-7.
880. Higuchi, S., et al., *Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology*. Clin Sci (Lond), 2007. **112**(8): p. 417-28.
881. Ohtsu, H., et al., *ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(9): p. e133-7.
882. Kelly, D.J., et al., *Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo*. Hypertension, 2004. **44**(2): p. 195-202.
883. Bouallegue, A., G. Vardatsikos, and A.K. Srivastava, *Role of insulin-like growth factor I receptor and c-Src in endothelin-1- and angiotensin II-induced PKB phosphorylation, and hypertrophic and proliferative responses in vascular smooth muscle cells*. Can J Physiol Pharmacol, 2009. **87**(12): p. 1009-18.
884. Zhai, P., et al., *An angiotensin II type 1 receptor mutant lacking epidermal growth factor receptor transactivation does not induce angiotensin II-mediated cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2006. **99**(5): p. 528-36.
885. Zahradka, P., et al., *Transactivation of the insulin-like growth factor-I receptor by angiotensin II mediates downstream signaling from the angiotensin II type 1 receptor to phosphatidylinositol 3-kinase*. Endocrinology, 2004. **145**(6): p. 2978-87.
886. Taniyama, Y., et al., *Mechanisms of reactive oxygen species-dependent downregulation of insulin receptor substrate-1 by angiotensin II*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1142-7.
887. Folli, F., et al., *Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk*. J Clin Invest, 1997. **100**(9): p. 2158-69.
888. Olivares-Reyes, J.A., A. Arellano-Plancarte, and J.R. Castillo-Hernandez, *Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **302**(2): p. 128-39.

889. Seta, K., et al., *AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 9268-77.
890. Shibata, T., et al., *Identification of regions in the human angiotensin II receptor type 1 responsible for Gi and Gq coupling by mutagenesis study*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **218**(1): p. 383-9.
891. Seta, K. and J. Sadoshima, *Phosphorylation of tyrosine 319 of the angiotensin II type 1 receptor mediates angiotensin II-induced trans-activation of the epidermal growth factor receptor*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9019-26.
892. Ali, M.S., et al., *Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(37): p. 23382-8.
893. Venema, R.C., et al., *Angiotensin II-induced association of phospholipase Cgamma1 with the G-protein-coupled AT1 receptor*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7703-8.
894. Qian, H., L. Pipolo, and W.G. Thomas, *Identification of protein kinase C phosphorylation sites in the angiotensin II (AT1A) receptor*. Biochem J, 1999. **343 Pt 3**: p. 637-44.
895. Kim, J., et al., *Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1442-7.
896. Poupart, M.E., et al., *ARF6 regulates angiotensin II type 1 receptor endocytosis by controlling the recruitment of AP-2 and clathrin*. Cell Signal, 2007. **19**(11): p. 2370-8.
897. Lee, M.H., et al., *Role of beta-arrestin-mediated desensitization and signaling in the control of angiotensin AT1a receptor-stimulated transcription*. J Biol Chem, 2008. **283**(4): p. 2088-97.
898. Ahn, S., et al., *{beta}-Arrestin-2 Mediates Anti-apoptotic Signaling through Regulation of BAD Phosphorylation*. J Biol Chem, 2009. **284**(13): p. 8855-65.
899. Hunton, D.L., et al., *Beta-arrestin 2-dependent angiotensin II type 1A receptor-mediated pathway of chemotaxis*. Mol Pharmacol, 2005. **67**(4): p. 1229-36.
900. Lanctot, P.M., et al., *Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor*. Biochemistry, 1999. **38**(27): p. 8621-7.

901. Ohyama, K., et al., *Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type 1A*. Regul Pept, 1995. **57**(2): p. 141-7.
902. Santos, E.L., et al., *Mutagenesis of the AT1 receptor reveals different binding modes of angiotensin II and [Sar1]-angiotensin II*. Regul Pept, 2004. **119**(3): p. 183-8.
903. Patny, A., P.V. Desai, and M.A. Avery, *Ligand-supported homology modeling of the human angiotensin II type 1 (AT1) receptor: insights into the molecular determinants of telmisartan binding*. Proteins, 2006. **65**(4): p. 824-42.
904. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C82-97.
905. Yang, F., et al., *Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I expression via transforming growth factor-beta-dependent and -independent Smad pathways: the role of Smad3*. Hypertension, 2009. **54**(4): p. 877-84.
906. Rodriguez-Vita, J., et al., *Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism*. Circulation, 2005. **111**(19): p. 2509-17.
907. Ruiz-Ortega, M., et al., *TGF-beta signaling in vascular fibrosis*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 196-206.
908. Keidar, S., et al., *Angiotensin II stimulates macrophage-mediated oxidation of low density lipoproteins*. Atherosclerosis, 1995. **115**(2): p. 201-15.
909. Scheidegger, K.J., S. Butler, and J.L. Witztum, *Angiotensin II increases macrophage-mediated modification of low density lipoprotein via a lipoxygenase-dependent pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 21609-15.
910. Keidar, S., M. Kaplan, and M. Aviram, *Angiotensin II-modified LDL is taken up by macrophages via the scavenger receptor, leading to cellular cholesterol accumulation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(1): p. 97-105.
911. Keidar, S., et al., *Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized ldl: a possible role for interleukin-6*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(9): p. 1464-9.
912. Cipollone, F., et al., *Blockade of the angiotensin II type 1 receptor stabilizes atherosclerotic plaques in humans by inhibiting prostaglandin E2-dependent matrix metalloproteinase activity*. Circulation, 2004. **109**(12): p. 1482-8.



913. Mazzolai, L., et al., *Endogenous angiotensin II induces atherosclerotic plaque vulnerability and elicits a Th1 response in ApoE<sup>-/-</sup> mice*. Hypertension, 2004. **44**(3): p. 277-82.
914. Montecucco, F., A. Pende, and F. Mach, *The renin-angiotensin system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: evidence from basic research and clinical studies*. Mediators Inflamm, 2009. **2009**: p. 752406.
915. Dol, F., et al., *Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan decreases lesion size, chemokine expression, and macrophage accumulation in apolipoprotein E-deficient mice*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001. **38**(3): p. 395-405.
916. Hayek, T., et al., *The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice*. Cardiovasc Res, 1999. **44**(3): p. 579-87.
917. Candido, R., et al., *Prevention of accelerated atherosclerosis by angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2002. **106**(2): p. 246-53.
918. Iwai, M., et al., *Deletion of angiotensin II type 2 receptor exaggerated atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice*. Circulation, 2005. **112**(11): p. 1636-43.
919. Otsui, K., et al., *Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries*. Heart Vessels, 2007. **22**(6): p. 416-22.
920. Ji, Y., et al., *Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells*. Cell Physiol Biochem, 2009. **23**(4-6): p. 265-76.
921. Wu, J., et al., *Angiotensin II upregulates Toll-like receptor 4 and enhances lipopolysaccharide-induced CD40 expression in rat peritoneal mesothelial cells*. Inflamm Res, 2009. **58**(8): p. 473-82.
922. Wolf, G., et al., *Angiotensin II upregulates toll-like receptor 4 on mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(6): p. 1585-93.
923. Dasu, M.R., A.C. Riosvelasco, and I. Jialal, *Candesartan inhibits Toll-like receptor expression and activity both in vitro and in vivo*. Atherosclerosis, 2009. **202**(1): p. 76-83.

924. Michelsen, K.S., et al., *Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10679-84.
925. Wang, F., et al., *Angiotensin II type-1 receptor antagonist attenuates LPS-induced acute lung injury*. Cytokine, 2009. **48**(3): p. 246-53.
926. Sanchez-Lemus, E., et al., *In vivo Angiotensin II AT1 receptor blockade selectively inhibits LPS-induced innate immune response and ACTH release in rat pituitary gland*. Brain Behav Immun, 2009. **23**(7): p. 945-57.
927. Sanchez-Lemus, E., et al., *Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat adrenal gland*. Endocrinology, 2008. **149**(10): p. 5177-88.
928. Limor, R., et al., *Angiotensin II increases the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human vascular smooth muscle cells via a lipoxygenase-dependent pathway*. Am J Hypertens, 2005. **18**(3): p. 299-307.
929. Sendra, J., et al., *Angiotensin II upregulates LDL receptor-related protein (LRP1) expression in the vascular wall: a new pro-atherogenic mechanism of hypertension*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(3): p. 581-9.
930. Hu, C., et al., *Modulation of angiotensin II-mediated hypertension and cardiac remodeling by lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 deletion*. Hypertension, 2008. **52**(3): p. 556-62.
931. Hu, C., A. Dandapat, and J.L. Mehta, *Angiotensin II induces capillary formation from endothelial cells via the LOX-1 dependent redox-sensitive pathway*. Hypertension, 2007. **50**(5): p. 952-7.
932. Luchtefeld, M., et al., *Angiotensin II type I-receptor antagonism prevents type IIA secretory phospholipase A2-dependent lipid peroxidation*. Atherosclerosis, 2007. **194**(1): p. 62-70.
933. Morawietz, H., et al., *Endothelial Protection, AT1 blockade and Cholesterol-Dependent Oxidative Stress: the EPAS trial*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I296-301.
934. Watanabe, T., et al., *Mildly oxidized low-density lipoprotein acts synergistically with angiotensin II in inducing vascular smooth muscle cell proliferation*. J Hypertens, 2001. **19**(6): p. 1065-73.

935. Ahn, S., et al., *Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35518-25.
936. Kim, J., et al., *Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase C pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor*. J Biol Chem, 2009. **284**(18): p. 11953-62.
937. Liao, D.F., et al., *Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6146-50.
938. Ushio-Fukai, M., et al., *Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(4): p. 489-95.
939. Eguchi, S., et al., *Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 8890-6.
940. Ghoda, L., X. Lin, and W.C. Greene, *The 90-kDa ribosomal S6 kinase (pp90rsk) phosphorylates the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha and stimulates its degradation in vitro*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 21281-8.
941. Sun, J. and X. Lin, *Beta-arrestin 2 is required for lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(44): p. 17085-90.
942. Ishida, M., et al., *Mnk1 is required for angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2003. **93**(12): p. 1218-24.
943. Li, F. and K.U. Malik, *Angiotensin II-induced Akt activation through the epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells is mediated by phospholipid metabolites derived by activation of phospholipase D*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(3): p. 1043-54.
944. Miller, W.E., et al., *beta-arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of beta-arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(15): p. 11312-9.
945. Rajagopalan, S., et al., *Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone*. J Clin Invest, 1996. **97**(8): p. 1916-23.

946. Touyz, R.M., *Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease*. Braz J Med Biol Res, 2004. **37**(8): p. 1263-73.
947. Hernandez-Presa, M., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis*. Circulation, 1997. **95**(6): p. 1532-41.
948. Han, Y., M.S. Runge, and A.R. Brasier, *Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors*. Circ Res, 1999. **84**(6): p. 695-703.
949. Dechend, R., et al., *AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase*. Circulation, 2003. **107**(12): p. 1632-9.
950. Gao, H., et al., *Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways*. Mol Cell, 2004. **14**(3): p. 303-17.
951. Pelletier, S., et al., *Rho family GTPases are required for activation of Jak/STAT signaling by G protein-coupled receptors*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(4): p. 1316-33.
952. Godin, C.M. and S.S. Ferguson, *The angiotensin II type 1 receptor induces membrane blebbing by coupling to Rho A, Rho kinase, and myosin light chain kinase*. Mol Pharmacol, 2010. **77**(6): p. 903-11.
953. Shin, E.Y., et al., *Involvement of betaPIX in angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells*. Exp Mol Med, 2009. **41**(6): p. 387-96.
954. Ohtsu, H., et al., *Signal-crosstalk between Rho/ROCK and c-Jun NH2-terminal kinase mediates migration of vascular smooth muscle cells stimulated by angiotensin II*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(9): p. 1831-6.
955. Tummala, P.E., et al., *Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis*. Circulation, 1999. **100**(11): p. 1223-9.
956. Chen, X.L., et al., *Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1998. **83**(9): p. 952-9.
957. Ni, W., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(3): p. 534-9.

958. Sahar, S., et al., *Cooperation of SRC-1 and p300 with NF-kappaB and CREB in angiotensin II-induced IL-6 expression in vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(7): p. 1528-34.
959. Papakonstantinou, E., et al., *Losartan inhibits the angiotensin II-induced modifications on fibrinolysis and matrix deposition by primary human vascular smooth muscle cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001. **38**(5): p. 715-28.
960. Fabricant, C.G., et al., *Virus-induced atherosclerosis*. J Exp Med, 1978. **148**(1): p. 335-40.
961. Stassen, F.R., T. Vainas, and C.A. Bruggeman, *Infection and atherosclerosis. An alternative view on an outdated hypothesis*. Pharmacol Rep, 2008. **60**(1): p. 85-92.
962. Cinemre, H., et al., *Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in acute myocardial infarction*. J Investig Med, 2007. **55**(8): p. 444-9.
963. Hall, C.J., et al., *Cryptococcus neoformans causes lipid peroxidation; therefore it is a potential inducer of atherogenesis*. Mycologia, 2010. **102**(3): p. 546-51.
964. Jegier, B., et al., *Mycotic DNA in non-atherosclerotic aortic wall of coronary patients is associated with sICAM-1 expression*. Circ J, 2010. **74**(4): p. 749-53.
965. Kern, J.M., V. Maass, and M. Maass, *Chlamydia pneumoniae adversely modulates vascular cell properties by direct interaction with signalling cascades*. Thromb Haemost, 2009. **102**(6): p. 1064-70.
966. Blasi, F., P. Tarsia, and S. Aliberti, *Chlamydophila pneumoniae*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(1): p. 29-35.
967. Grayston, J.T., et al., *Azithromycin for the secondary prevention of coronary events*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1637-45.
968. Cannon, C.P., et al., *Antibiotic treatment of Chlamydia pneumoniae after acute coronary syndrome*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1646-54.
969. Andraws, R., J.S. Berger, and D.L. Brown, *Effects of antibiotic therapy on outcomes of patients with coronary artery disease: a meta-analysis of randomized controlled trials*. JAMA, 2005. **293**(21): p. 2641-7.
970. Simmonds, J., et al., *Endothelial dysfunction and cytomegalovirus replication in pediatric heart transplantation*. Circulation, 2008. **117**(20): p. 2657-61.
971. Merigan, T.C., et al., *A controlled trial of ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after heart transplantation*. N Engl J Med, 1992. **326**(18): p. 1182-6.

972. Shen, G.K., et al., *Eradication of cytomegalovirus reactivation disease using high-dose acyclovir and targeted intravenous ganciclovir in kidney and kidney/pancreas transplantation*. Transplantation, 1997. **64**(6): p. 931-3.
973. Valantine, H.A., et al., *Impact of prophylactic immediate posttransplant ganciclovir on development of transplant atherosclerosis: a post hoc analysis of a randomized, placebo-controlled study*. Circulation, 1999. **100**(1): p. 61-6.
974. Grahame-Clarke, C., et al., *Human cytomegalovirus seropositivity is associated with impaired vascular function*. Circulation, 2003. **108**(6): p. 678-83.
975. Jespersen, C.M., et al., *Randomised placebo controlled multicentre trial to assess short term clarithromycin for patients with stable coronary heart disease: CLARICOR trial*. BMJ, 2006. **332**(7532): p. 22-7.
976. O'Connor, C.M., et al., *Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events: the WIZARD study: a randomized controlled trial*. JAMA, 2003. **290**(11): p. 1459-66.
977. Dunbar, L.M., *Current issues in the management of bacterial respiratory tract disease: the challenge of antibacterial resistance*. Am J Med Sci, 2003. **326**(6): p. 360-8.
978. Cazzola, M., et al., *Evaluation of lung tissue and hilar lymph node concentrations of azithromycin*. Int J Clin Pharmacol Ther, 1994. **32**(2): p. 88-91.
979. Yoshida, H. and T. Furuta, *[Tissue penetration properties of macrolide antibiotics--comparative tissue distribution of erythromycin-stearate, clarithromycin, roxithromycin and azithromycin in rats]*. Jpn J Antibiot, 1999. **52**(7): p. 497-503.
980. Espinola-Klein, C., et al., *Impact of infectious burden on extent and long-term prognosis of atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(1): p. 15-21.
981. Elkind, M.S., et al., *Infectious burden and carotid plaque thickness: the northern Manhattan study*. Stroke, 2010. **41**(3): p. e117-22.
982. Espinola-Klein, C., et al., *Impact of infectious burden on progression of carotid atherosclerosis*. Stroke, 2002. **33**(11): p. 2581-6.
983. Varnum, S.M., et al., *Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10960-6.
984. Michelson, S., et al., *Human cytomegalovirus carries serine/threonine protein phosphatases PP1 and a host-cell derived PP2A*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 1415-23.

985. Spear, G.T., et al., *Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV)*. J Immunol, 1995. **155**(9): p. 4376-81.
986. Wright, J.F., et al., *Host cellular annexin II is associated with cytomegalovirus particles isolated from cultured human fibroblasts*. J Virol, 1995. **69**(8): p. 4784-91.
987. Bresnahan, W.A. and T. Shenk, *A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2373-6.
988. Terhune, S.S., J. Schroer, and T. Shenk, *RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration*. J Virol, 2004. **78**(19): p. 10390-8.
989. Britt, W.J. and M. Mach, *Human cytomegalovirus glycoproteins*. Intervirology, 1996. **39**(5-6): p. 401-12.
990. Compton, T., et al., *Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2*. J Virol, 2003. **77**(8): p. 4588-96.
991. Boyle, K.A., R.L. Pietropaolo, and T. Compton, *Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3607-13.
992. Boyle, K.A. and T. Compton, *Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 1826-33.
993. Ogawa-Goto, K., et al., *Binding of human cytomegalovirus to sulfated glucuronyl glycosphingolipids and their inhibitory effects on the infection*. J Gen Virol, 1998. **79** ( Pt 10): p. 2533-41.
994. Compton, T., D.M. Nowlin, and N.R. Cooper, *Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate*. Virology, 1993. **193**(2): p. 834-41.
995. Wang, X., et al., *Integrin alphavbeta3 is a coreceptor for human cytomegalovirus*. Nat Med, 2005. **11**(5): p. 515-21.
996. Feire, A.L., H. Koss, and T. Compton, *Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(43): p. 15470-5.

997. Isaacson, M.K., A.L. Feire, and T. Compton, *Epidermal growth factor receptor is not required for human cytomegalovirus entry or signaling*. J Virol, 2007. **81**(12): p. 6241-7.
998. Wang, X., et al., *Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 456-61.
999. Vanarsdall, A.L., et al., *Human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH/gL mediate epithelial cell-cell fusion when expressed either in cis or in trans*. J Virol, 2008. **82**(23): p. 11837-50.
1000. Lopper, M. and T. Compton, *Coiled-coil domains in glycoproteins B and H are involved in human cytomegalovirus membrane fusion*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 8333-41.
1001. Ogawa-Goto, K., et al., *Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid*. J Virol, 2003. **77**(15): p. 8541-7.
1002. Nguyen, N.L., A.N. Loveland, and W. Gibson, *Nuclear localization sequences in cytomegalovirus capsid assembly proteins (UL80 proteins) are required for virus production: inactivating NLS1, NLS2, or both affects replication to strikingly different extents*. J Virol, 2008. **82**(11): p. 5381-9.
1003. Griffiths, P.D. and J.E. Grundy, *Molecular biology and immunology of cytomegalovirus*. Biochem J, 1987. **241**(2): p. 313-24.
1004. Nevels, M., C. Paulus, and T. Shenk, *Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17234-9.
1005. Kang, H., et al., *Inhibition of SUMO-independent PML oligomerization by the human cytomegalovirus IE1 protein*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 8): p. 2181-90.
1006. Paulus, C., S. Krauss, and M. Nevels, *A human cytomegalovirus antagonist of type I IFN-dependent signal transducer and activator of transcription signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3840-5.
1007. Shlapobersky, M., et al., *Repression of HMGA2 gene expression by human cytomegalovirus involves the IE2 86-kilodalton protein and is necessary for efficient viral replication and inhibition of cyclin A transcription*. J Virol, 2006. **80**(20): p. 9951-61.
1008. Ho, M., *The history of cytomegalovirus and its diseases*. Med Microbiol Immunol, 2008. **197**(2): p. 65-73.



1009. Cepeda, V., M. Esteban, and A. Fraile-Ramos, *Human cytomegalovirus final envelopment on membranes containing both trans-Golgi network and endosomal markers*. Cell Microbiol, 2010. **12**(3): p. 386-404.
1010. Sinzger, C., et al., *Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 12): p. 3021-35.
1011. Ellsmore, V., G.G. Reid, and N.D. Stow, *Detection of human cytomegalovirus DNA replication in non-permissive Vero and 293 cells*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 3): p. 639-45.
1012. St Jeor, S. and F. Rapp, *Cytomegalovirus: conversion of nonpermissive cells to a permissive state for virus replication*. Science, 1973. **181**(104): p. 1060-1.
1013. Moghadasian, M.H., *Experimental atherosclerosis: a historical overview*. Life Sci, 2002. **70**(8): p. 855-65.
1014. Powers, C. and K. Fruh, *Rhesus CMV: an emerging animal model for human CMV*. Med Microbiol Immunol, 2008. **197**(2): p. 109-15.
1015. Leendertz, F.H., et al., *Novel cytomegaloviruses in free-ranging and captive great apes: phylogenetic evidence for bidirectional horizontal transmission*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 10): p. 2386-94.
1016. Maul, G.G. and D. Negorev, *Differences between mouse and human cytomegalovirus interactions with their respective hosts at immediate early times of the replication cycle*. Med Microbiol Immunol, 2008. **197**(2): p. 241-9.
1017. Vliegen, I., et al., *Mouse cytomegalovirus antigenic immune stimulation is sufficient to aggravate atherosclerosis in hypercholesterolemic mice*. Atherosclerosis, 2005. **181**(1): p. 39-44.
1018. Berencsi, K., et al., *Early atherosclerotic plaques in the aorta following cytomegalovirus infection of mice*. Cell Adhes Commun, 1998. **5**(1): p. 39-47.
1019. Cheng, J., et al., *Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000427.
1020. Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley, *Fields virology*. 5th ed. 2007, Philadelphia, Pa. ; London: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 2 v. (xix, 3091, 86 ).
1021. Dix, R.D. and S.W. Cousins, *AIDS-related cytomegalovirus retinitis: lessons from the laboratory*. Curr Eye Res, 2004. **29**(2-3): p. 91-101.

1022. Hsue, P.Y., et al., *Increased carotid intima-media thickness in HIV patients is associated with increased cytomegalovirus-specific T-cell responses*. AIDS, 2006. **20**(18): p. 2275-83.
1023. Lautenschlager, I., *CMV infection, diagnosis and antiviral strategies after liver transplantation*. Transpl Int, 2009. **22**(11): p. 1031-40.
1024. Legendre, C. and M. Pascual, *Improving outcomes for solid-organ transplant recipients at risk from cytomegalovirus infection: late-onset disease and indirect consequences*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(5): p. 732-40.
1025. Valantine, H.A., *The role of viruses in cardiac allograft vasculopathy*. Am J Transplant, 2004. **4**(2): p. 169-77.
1026. Herzum, M., et al., *[Cytomegalovirus and herpes simplex virus in pathogenesis and progression of native arteriosclerosis and recurrent stenosis after intervention]*. Herz, 1998. **23**(3): p. 193-6.
1027. Rahmani, M., et al., *Allograft vasculopathy versus atherosclerosis*. Circ Res, 2006. **99**(8): p. 801-15.
1028. Hendrix, R.M., et al., *Widespread presence of cytomegalovirus DNA in tissues of healthy trauma victims*. J Clin Pathol, 1997. **50**(1): p. 59-63.
1029. Hendrix, M.G., et al., *The presence of cytomegalovirus nucleic acids in arterial walls of atherosclerotic and nonatherosclerotic patients*. Am J Pathol, 1989. **134**(5): p. 1151-7.
1030. Hendrix, M.G., M. Daemen, and C.A. Bruggeman, *Cytomegalovirus nucleic acid distribution within the human vascular tree*. Am J Pathol, 1991. **138**(3): p. 563-7.
1031. Melnick, J.L., et al., *Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells*. Lancet, 1983. **2**(8351): p. 644-7.
1032. Pampou, S., et al., *Cytomegalovirus genome and the immediate-early antigen in cells of different layers of human aorta*. Virchows Arch, 2000. **436**(6): p. 539-52.
1033. Reeves, M.B., et al., *Vascular endothelial and smooth muscle cells are unlikely to be major sites of latency of human cytomegalovirus in vivo*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 11): p. 3337-41.
1034. Ricotta, D., et al., *Adult human heart microvascular endothelial cells are permissive for non-lytic infection by human cytomegalovirus*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(2): p. 440-8.

1035. Tumilowicz, J.J., et al., *Replication of cytomegalovirus in human arterial smooth muscle cells*. J Virol, 1985. **56**(3): p. 839-45.
1036. Hendrix, M.G., et al., *High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis*. Am J Pathol, 1990. **136**(1): p. 23-8.
1037. Guetta, E., et al., *Monocytes harboring cytomegalovirus: interactions with endothelial cells, smooth muscle cells, and oxidized low-density lipoprotein. Possible mechanisms for activating virus delivered by monocytes to sites of vascular injury*. Circ Res, 1997. **81**(1): p. 8-16.
1038. Kondo, K., H. Kaneshima, and E.S. Mocarski, *Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 11879-83.
1039. Nieto, F.J., et al., *Cohort study of cytomegalovirus infection as a risk factor for carotid intimal-medial thickening, a measure of subclinical atherosclerosis*. Circulation, 1996. **94**(5): p. 922-7.
1040. Ridker, P.M., et al., *Baseline IgG antibody titers to Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, herpes simplex virus, and cytomegalovirus and the risk for cardiovascular disease in women*. Ann Intern Med, 1999. **131**(8): p. 573-7.
1041. Zhou, Y.F., et al., *The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta-receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **256**(3): p. 608-13.
1042. Zhou, Y.F., et al., *Human cytomegalovirus increases modified low density lipoprotein uptake and scavenger receptor mRNA expression in vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1996. **98**(9): p. 2129-38.
1043. Stinski, M.F. and D.T. Petrik, *Functional roles of the human cytomegalovirus essential IE86 protein*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 133-52.
1044. Fabricant, C.G., L. Krook, and J.H. Gillespie, *Virus-induced cholesterol crystals*. Science, 1973. **181**(99): p. 566-7.
1045. Beisser, P.S., et al., *Chemokines and chemokine receptors encoded by cytomegaloviruses*. Curr Top Microbiol Immunol, 2008. **325**: p. 221-42.
1046. Streblow, D.N., et al., *The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration*. Cell, 1999. **99**(5): p. 511-20.

1047. Streblow, D.N., et al., *Human cytomegalovirus chemokine receptor US28-induced smooth muscle cell migration is mediated by focal adhesion kinase and Src*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50456-65.
1048. Vomazke, J., et al., *Differential ligand binding to a human cytomegalovirus chemokine receptor determines cell type-specific motility*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000304.
1049. Casarosa, P., et al., *Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1133-7.
1050. Miller, W.E., et al., *G-protein-coupled receptor (GPCR) kinase phosphorylation and beta-arrestin recruitment regulate the constitutive signaling activity of the human cytomegalovirus US28 GPCR*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21663-71.
1051. Reinke, P., et al., *Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients*. Transpl Infect Dis, 1999. **1**(3): p. 157-64.
1052. Stein, J., et al., *Tumour necrosis factor alpha stimulates the activity of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter in immature monocytic cells*. J Gen Virol, 1993. **74** ( Pt 11): p. 2333-8.
1053. Boomker, J.M., et al., *The human cytomegalovirus-encoded receptor US28 increases the activity of the major immediate-early promoter/enhancer*. Virus Res, 2006. **118**(1-2): p. 196-200.
1054. Maussang, D., et al., *Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(35): p. 13068-73.
1055. Maussang, D., et al., *The human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes angiogenesis and tumor formation via cyclooxygenase-2*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 2861-9.
1056. Shibutani, T., et al., *Pertussis toxin-sensitive G proteins as mediators of the signal transduction pathways activated by cytomegalovirus infection of smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1997. **100**(8): p. 2054-61.
1057. Fields, T.A. and P.J. Casey, *Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins*. Biochem J, 1997. **321** ( Pt 3): p. 561-71.
1058. Zipeto, D., et al., *Kinetics of transcription of human cytomegalovirus chemokine receptor US28 in different cell types*. J Gen Virol, 1999. **80** ( Pt 3): p. 543-7.

1059. Nogalski, M.T., et al., *The human cytomegalovirus virion possesses an activated casein kinase II that allows for the rapid phosphorylation of the inhibitor of NF-kappaB, IkappaBalpha*. J Virol, 2007. **81**(10): p. 5305-14.
1060. Billstrom Schroeder, M. and G.S. Worthen, *Viral regulation of RANTES expression during human cytomegalovirus infection of endothelial cells*. J Virol, 2001. **75**(7): p. 3383-90.
1061. Preston, C.M., A.N. Harman, and M.J. Nicholl, *Activation of interferon response factor-3 in human cells infected with herpes simplex virus type 1 or human cytomegalovirus*. J Virol, 2001. **75**(19): p. 8909-16.
1062. Manning, G., et al., *The protein kinase complement of the human genome*. Science, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.
1063. Nara, K., et al., *Cloning and characterization of a novel serine/threonine protein kinase gene expressed predominantly in developing brain*. Eur J Biochem, 2001. **268**(9): p. 2642-51.
1064. Tanaka, M., et al., *Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice*. Immunity, 1999. **10**(4): p. 421-9.
1065. Li, Q., et al., *IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton*. Genes Dev, 1999. **13**(10): p. 1322-8.
1066. Hemmi, H., et al., *The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1641-50.
1067. Jeffrey, P.D., et al., *Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex*. Nature, 1995. **376**(6538): p. 313-20.
1068. Ling, L., Z. Cao, and D.V. Goeddel, *NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3792-7.
1069. Nakano, H., et al., *Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3537-42.
1070. Wang, C., et al., *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 346-51.
1071. Sun, L., et al., *The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes*. Mol Cell, 2004. **14**(3): p. 289-301.

1072. Sun, W., et al., *MEKK3 is required for lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation*. Cell Signal, 2009. **21**(10): p. 1488-94.
1073. Zhao, Q. and F.S. Lee, *Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8355-8.
1074. Yang, J., et al., *The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 620-4.
1075. Clark, K., et al., *Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and IkappaB kinase epsilon: a distinct upstream kinase mediates Ser-172 phosphorylation and activation*. J Biol Chem, 2009. **284**(21): p. 14136-46.
1076. Chau, T.L., et al., *Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK-epsilon similarly activated?* Trends Biochem Sci, 2008. **33**(4): p. 171-80.
1077. Schomer-Miller, B., et al., *Regulation of IkappaB kinase (IKK) complex by IKKgamma-dependent phosphorylation of the T-loop and C terminus of IKKbeta*. J Biol Chem, 2006. **281**(22): p. 15268-76.
1078. Delhase, M., et al., *Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation*. Science, 1999. **284**(5412): p. 309-13.
1079. Wada, K., et al., *Ro52-mediated monoubiquitination of IKK{beta} down-regulates NF-{kappa}B signalling*. J Biochem, 2009. **146**(6): p. 821-32.
1080. Carter, R.S., et al., *Site-specific monoubiquitination of IkappaB kinase IKKbeta regulates its phosphorylation and persistent activation*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 43272-9.
1081. Higashimoto, T., et al., *Regulation of I(kappa)B kinase complex by phosphorylation of (gamma)-binding domain of I(kappa)B kinase (beta) by Polo-like kinase 1*. J Biol Chem, 2008. **283**(51): p. 35354-67.
1082. Ikeda, F., et al., *Involvement of the ubiquitin-like domain of TBK1/IKK-i kinases in regulation of IFN-inducible genes*. EMBO J, 2007. **26**(14): p. 3451-62.
1083. May, M.J., et al., *A novel ubiquitin-like domain in IkappaB kinase beta is required for functional activity of the kinase*. J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45528-39.
1084. Kray, A.E., et al., *Positive regulation of IkappaB kinase signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A*. J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 35974-82.

1085. Prajapati, S., et al., *Protein phosphatase 2C $\beta$  association with the IkappaB kinase complex is involved in regulating NF-kappaB activity.* J Biol Chem, 2004. **279**(3): p. 1739-46.
1086. Li, H.Y., et al., *Deactivation of the kinase IKK by CUEDC2 through recruitment of the phosphatase PPI.* Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 533-41.
1087. Gabhann, J.N., et al., *Absence of SHIP-1 results in constitutive phosphorylation of tank-binding kinase 1 and enhanced TLR3-dependent IFN-beta production.* J Immunol, 2010. **184**(5): p. 2314-20.
1088. Parvatiyar, K., G.N. Barber, and E.W. Harhaj, *TAX1BP1 and A20 inhibit antiviral signaling by targeting TBK1-IKKi kinases.* J Biol Chem, 2010. **285**(20): p. 14999-5009.
1089. Lee, D.F., et al., *KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKK $\beta$ .* Mol Cell, 2009. **36**(1): p. 131-40.
1090. Huang, W.C., et al., *Tyrosine phosphorylation of I-kappa B kinase alpha/beta by protein kinase C-dependent c-Src activation is involved in TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression.* J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4767-75.
1091. Liu, R., K. Aupperle, and R. Terkeltaub, *Src family protein tyrosine kinase signaling mediates monosodium urate crystal-induced IL-8 expression by monocytic THP-1 cells.* J Leukoc Biol, 2001. **70**(6): p. 961-8.
1092. Chiu, Y.C., et al., *Thrombin-induced IL-6 production in human synovial fibroblasts is mediated by PAR1, phospholipase C, protein kinase C alpha, c-Src, NF-kappa B and p300 pathway.* Mol Immunol, 2008. **45**(6): p. 1587-99.
1093. Lin, C.H., et al., *c-Src mediates thrombin-induced NF-kappaB activation and IL-8/CXCL8 expression in lung epithelial cells.* J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3427-38.
1094. Ozes, O.N., et al., *NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase.* Nature, 1999. **401**(6748): p. 82-5.
1095. Tai, D.J., et al., *SGK1 phosphorylation of IkappaB Kinase alpha and p300 Up-regulates NF-kappaB activity and increases N-Methyl-D-aspartate receptor NR2A and NR2B expression.* J Biol Chem, 2009. **284**(7): p. 4073-89.
1096. Tanaka, H., N. Fujita, and T. Tsuruo, *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1-mediated IkappaB kinase beta (IkkB) phosphorylation activates NF-kappaB signaling.* J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40965-73.

1097. Yoshida, K., et al., *ATM-dependent nuclear accumulation of IKK-alpha plays an important role in the regulation of p73-mediated apoptosis in response to cisplatin*. *Oncogene*, 2008. **27**(8): p. 1183-8.
1098. Tenoever, B.R., et al., *Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity*. *Science*, 2007. **315**(5816): p. 1274-8.
1099. Miyahira, A.K., et al., *TANK-binding kinase-1 plays an important role during in vitro and in vivo type I IFN responses to DNA virus infections*. *J Immunol*, 2009. **182**(4): p. 2248-57.
1100. Kobiyama, K., et al., *A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant*. *J Immunol*, 2009. **182**(3): p. 1593-601.
1101. Sil, A.K., et al., *IkkappaB kinase-alpha acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis*. *Nature*, 2004. **428**(6983): p. 660-4.
1102. Marinari, B., et al., *The tumor suppressor activity of IKKalpha in stratified epithelia is exerted in part via the TGF-beta antiproliferative pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(44): p. 17091-6.
1103. Gloire, G., et al., *Promoter-dependent effect of IKKalpha on NF-kappaB/p65 DNA binding*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(29): p. 21308-18.
1104. Yamamoto, Y., et al., *Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression*. *Nature*, 2003. **423**(6940): p. 655-9.
1105. Renner, F., R. Moreno, and M.L. Schmitz, *SUMOylation-dependent localization of IKKepsilon in PML nuclear bodies is essential for protection against DNA-damage-triggered cell death*. *Mol Cell*, 2010. **37**(4): p. 503-15.
1106. Lin, R., et al., *Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKKepsilon molecular complex from the mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage*. *J Virol*, 2006. **80**(12): p. 6072-83.
1107. Ishikawa, H., Z. Ma, and G.N. Barber, *STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity*. *Nature*, 2009. **461**(7265): p. 788-92.
1108. Balkhi, M.Y., K.A. Fitzgerald, and P.M. Pitha, *IKKalpha negatively regulates IRF-5 function in a MyD88-TRAF6 pathway*. *Cell Signal*, 2010. **22**(1): p. 117-27.



1109. Cheng, T.F., et al., *Differential activation of IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-5 transcription factors during viral infection*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7462-70.
1110. Garbati, M.R. and T.D. Gilmore, *Ser484 and Ser494 in REL are the major sites of IKK phosphorylation in vitro: evidence that IKK does not directly enhance GAL4-REL transactivation*. Gene Expr, 2008. **14**(4): p. 195-205.
1111. Harris, J., et al., *Nuclear accumulation of cRel following C-terminal phosphorylation by TBK1/IKK epsilon*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2527-35.
1112. Peters, R.T., S.M. Liao, and T. Maniatis, *IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex*. Mol Cell, 2000. **5**(3): p. 513-22.
1113. Li, Z.W., et al., *The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1839-45.
1114. Sakurai, H., et al., *IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30353-6.
1115. Buss, H., et al., *Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF-{kappa}B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I{kappa}B kinase (IKK)-{alpha}, IKK{beta}, IKK{epsilon}, TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55633-43.
1116. Huang, W.C., et al., *Phosphorylation of CBP by IKKalpha promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF-kappaB*. Mol Cell, 2007. **26**(1): p. 75-87.
1117. Hoberg, J.E., F. Yeung, and M.W. Mayo, *SMRT derepression by the IkappaB kinase alpha: a prerequisite to NF-kappaB transcription and survival*. Mol Cell, 2004. **16**(2): p. 245-55.
1118. Wu, R.C., et al., *Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(10): p. 3549-61.
1119. Park, K.J., et al., *Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation*. Mol Cell, 2005. **18**(1): p. 71-82.
1120. Irelan, J.T., et al., *A role for IkappaB kinase 2 in bipolar spindle assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 16940-5.

1121. Kwak, Y.T., et al., *IkappaB kinase alpha regulates subcellular distribution and turnover of cyclin D1 by phosphorylation*. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 33945-52.
1122. Lamberti, C., et al., *Regulation of beta-catenin function by the IkappaB kinases*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42276-86.
1123. Lawrence, T., et al., *IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation*. Nature, 2005. **434**(7037): p. 1138-43.
1124. Carayol, N. and C.Y. Wang, *IKKalpha stabilizes cytosolic beta-catenin by inhibiting both canonical and non-canonical degradation pathways*. Cell Signal, 2006. **18**(11): p. 1941-6.
1125. Sharma, S., et al., *Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1148-51.
1126. Hoshino, K., et al., *IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9*. Nature, 2006. **440**(7086): p. 949-53.
1127. Schroder, M., M. Baran, and A.G. Bowie, *Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation*. EMBO J, 2008. **27**(15): p. 2147-57.
1128. Soulat, D., et al., *The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response*. EMBO J, 2008. **27**(15): p. 2135-46.
1129. Chariot, A., *The NF-kappaB-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(8): p. 404-13.
1130. Clement, J.F., S. Meloche, and M.J. Servant, *The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis*. Cell Res, 2008. **18**(9): p. 889-99.
1131. Zhong, B., et al., *The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation*. Immunity, 2008. **29**(4): p. 538-50.
1132. Sweeney, S.E., et al., *Regulation of c-Jun phosphorylation by the I kappa B kinase-epsilon complex in fibroblast-like synoviocytes*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6424-30.
1133. Guo, J.P., et al., *IKKepsilon phosphorylation of estrogen receptor alpha Ser-167 and contribution to tamoxifen resistance in breast cancer*. J Biol Chem, 2010. **285**(6): p. 3676-84.

1134. Munoz, M.C., et al., *TANK-binding kinase 1 mediates phosphorylation of insulin receptor at serine residue 994: a potential link between inflammation and insulin resistance*. J Endocrinol, 2009. **201**(2): p. 185-97.
1135. Weitsman, G.E., et al., *Estrogen receptor-alpha phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression*. Cancer Res, 2006. **66**(20): p. 10162-70.
1136. Hutti, J.E., et al., *Phosphorylation of the tumor suppressor CYLD by the breast cancer oncogene IKKepsilon promotes cell transformation*. Mol Cell, 2009. **34**(4): p. 461-72.
1137. Sen, R. and D. Baltimore, *Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism*. Cell, 1986. **47**(6): p. 921-8.
1138. Atchison, M.L. and R.P. Perry, *The role of the kappa enhancer and its binding factor NF-kappa B in the developmental regulation of kappa gene transcription*. Cell, 1987. **48**(1): p. 121-8.
1139. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor*. Cell, 1988. **53**(2): p. 211-7.
1140. Baeuerle, P.A., et al., *Phorbol-ester-induced activation of the NF-kappa B transcription factor involves dissociation of an apparently cytoplasmic NF-kappa B/inhibitor complex*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1988. **53 Pt 2**: p. 789-98.
1141. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor*. Science, 1988. **242**(4878): p. 540-6.
1142. Lowenthal, J.W., et al., *Tumor necrosis factor alpha induces proteins that bind specifically to kappa B-like enhancer elements and regulate interleukin 2 receptor alpha-chain gene expression in primary human T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2331-5.
1143. Osborn, L., S. Kunkel, and G.J. Nabel, *Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2336-40.
1144. Visvanathan, K.V. and S. Goodbourn, *Double-stranded RNA activates binding of NF-kappa B to an inducible element in the human beta-interferon promoter*. EMBO J, 1989. **8**(4): p. 1129-38.

1145. Lenardo, M.J., et al., *The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction*. Cell, 1989. **57**(2): p. 287-94.
1146. Nabel, G. and D. Baltimore, *An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells*. Nature, 1987. **326**(6114): p. 711-3.
1147. Cherrington, J.M. and E.S. Mocarski, *Human cytomegalovirus iel transactivates the alpha promoter-enhancer via an 18-base-pair repeat element*. J Virol, 1989. **63**(3): p. 1435-40.
1148. Ghosh, S. and D. Baltimore, *Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B*. Nature, 1990. **344**(6267): p. 678-82.
1149. Beg, A.A., et al., *I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention*. Genes Dev, 1992. **6**(10): p. 1899-913.
1150. Henkel, T., et al., *Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B*. Nature, 1993. **365**(6442): p. 182-5.
1151. Brown, K., et al., *Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1485-8.
1152. Sun, S.C., et al., *NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway*. Science, 1993. **259**(5103): p. 1912-5.
1153. Naumann, M. and C. Scheidereit, *Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations*. EMBO J, 1994. **13**(19): p. 4597-607.
1154. Barroga, C.F., et al., *Constitutive phosphorylation of I kappa B alpha by casein kinase II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7637-41.
1155. Lin, R., et al., *Phosphorylation of IkappaBalpha in the C-terminal PEST domain by casein kinase II affects intrinsic protein stability*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1401-9.
1156. Traenckner, E.B., et al., *Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli*. EMBO J, 1995. **14**(12): p. 2876-83.
1157. Whiteside, S.T., et al., *N- and C-terminal sequences control degradation of MAD3/I kappa B alpha in response to inducers of NF-kappa B activity*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5339-45.

1158. Chen, Z., et al., *Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway*. Genes Dev, 1995. **9**(13): p. 1586-97.
1159. DiDonato, J., et al., *Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(4): p. 1295-304.
1160. Jobin, C., et al., *Inhibition of proinflammatory molecule production by adenovirus-mediated expression of a nuclear factor kappaB super-repressor in human intestinal epithelial cells*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 410-8.
1161. Malinin, N.L., et al., *MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1*. Nature, 1997. **385**(6616): p. 540-4.
1162. Regnier, C.H., et al., *Identification and characterization of an IkappaB kinase*. Cell, 1997. **90**(2): p. 373-83.
1163. Lee, F.S., et al., *Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway*. Cell, 1997. **88**(2): p. 213-22.
1164. Chen, Z.J., L. Parent, and T. Maniatis, *Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity*. Cell, 1996. **84**(6): p. 853-62.
1165. DiDonato, J.A., et al., *A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB*. Nature, 1997. **388**(6642): p. 548-54.
1166. Rothwarf, D.M., et al., *IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex*. Nature, 1998. **395**(6699): p. 297-300.
1167. Yamaoka, S., et al., *Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation*. Cell, 1998. **93**(7): p. 1231-40.
1168. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
1169. Pasparakis, M., et al., *TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2*. Nature, 2002. **417**(6891): p. 861-6.
1170. Chen, I.S., K.C. Wilhelmsen, and H.M. Temin, *Structure and expression of c-rel, the cellular homolog to the oncogene of reticuloendotheliosis virus strain T*. J Virol, 1983. **45**(1): p. 104-13.
1171. Ballard, D.W., et al., *The v-rel oncogene encodes a kappa B enhancer binding protein that inhibits NF-kappa B function*. Cell, 1990. **63**(4): p. 803-14.

1172. Ghosh, S., et al., *Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal*. Cell, 1990. **62**(5): p. 1019-29.
1173. Siebenlist, U., G. Franzoso, and K. Brown, *Structure, regulation and function of NF-kappa B*. Annu Rev Cell Biol, 1994. **10**: p. 405-55.
1174. Kunsch, C., S.M. Ruben, and C.A. Rosen, *Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(10): p. 4412-21.
1175. Marienfeld, R., et al., *RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 19852-60.
1176. Huang, D.B., D. Vu, and G. Ghosh, *NF-kappaB RelB forms an intertwined homodimer*. Structure, 2005. **13**(9): p. 1365-73.
1177. Dobrzanski, P., R.P. Ryseck, and R. Bravo, *Differential interactions of Rel-NF-kappa B complexes with I kappa B alpha determine pools of constitutive and inducible NF-kappa B activity*. EMBO J, 1994. **13**(19): p. 4608-16.
1178. Carrasco, D., R.P. Ryseck, and R. Bravo, *Expression of relB transcripts during lymphoid organ development: specific expression in dendritic antigen-presenting cells*. Development, 1993. **118**(4): p. 1221-31.
1179. Lernbecher, T., U. Muller, and T. Wirth, *Distinct NF-kappa B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation*. Nature, 1993. **365**(6448): p. 767-70.
1180. Huang, D.B., et al., *Crystal structure of a free kappaB DNA: insights into DNA recognition by transcription factor NF-kappaB*. J Mol Biol, 2005. **346**(1): p. 147-60.
1181. Chen, X., K. Kandasamy, and R.K. Srivastava, *Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling*. Cancer Res, 2003. **63**(5): p. 1059-66.
1182. Sen, R., *Control of B lymphocyte apoptosis by the transcription factor NF-kappaB*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 871-83.
1183. Ouaz, F., et al., *Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits*. Immunity, 2002. **16**(2): p. 257-70.
1184. Gerondakis, S., et al., *Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6781-99.

1185. Perkins, N.D., et al., *Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator*. Science, 1997. **275**(5299): p. 523-7.
1186. Gerritsen, M.E., et al., *CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 2927-32.
1187. Wadgaonkar, R., et al., *CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor-kappaB and p53 signaling*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 1879-82.
1188. Sheppard, K.A., et al., *Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(9): p. 6367-78.
1189. Zhong, H., et al., *The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1*. Mol Cell, 2002. **9**(3): p. 625-36.
1190. Zhong, H., R.E. Voll, and S. Ghosh, *Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300*. Mol Cell, 1998. **1**(5): p. 661-71.
1191. Savinova, O.V., A. Hoffmann, and G. Ghosh, *The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes*. Mol Cell, 2009. **34**(5): p. 591-602.
1192. Vatsyayan, J., et al., *SUMO1 modification of NF-kappaB2/p100 is essential for stimuli-induced p100 phosphorylation and processing*. EMBO Rep, 2008. **9**(9): p. 885-90.
1193. Zandi, E., et al., *The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation*. Cell, 1997. **91**(2): p. 243-52.
1194. Heilker, R., et al., *The kinetics of association and phosphorylation of IkappaB isoforms by IkappaB kinase 2 correlate with their cellular regulation in human endothelial cells*. Biochemistry, 1999. **38**(19): p. 6231-8.
1195. Kato, T., Jr., et al., *CK2 Is a C-Terminal IkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response*. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 829-39.
1196. Betts, J.C. and G.J. Nabel, *Differential regulation of NF-kappaB2(p100) processing and control by amino-terminal sequences*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(11): p. 6363-71.
1197. Guan, H., S. Hou, and R.P. Ricciardi, *DNA binding of repressor nuclear factor-kappaB p50/p50 depends on phosphorylation of Ser337 by the protein kinase A catalytic subunit*. J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 9957-62.

1198. Neumann, M. and M. Naumann, *Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity*. FASEB J, 2007. **21**(11): p. 2642-54.
1199. Viatour, P., et al., *Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(1): p. 43-52.
1200. Campbell, K.J. and N.D. Perkins, *Post-translational modification of RelA(p65) NF-kappaB*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 6): p. 1087-9.
1201. O'Dea, E. and A. Hoffmann, *The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(1): p. a000216.
1202. Dejardin, E., *The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(9): p. 1161-79.
1203. Xiao, G., E.W. Harhaj, and S.C. Sun, *NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100*. Mol Cell, 2001. **7**(2): p. 401-9.
1204. Fong, A., et al., *S9, a 19 S proteasome subunit interacting with ubiquitinated NF-kappaB2/p100*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40697-702.
1205. Amir, R.E., et al., *Mechanism of processing of the NF-kappa B2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF(beta-TrCP) ubiquitin ligase*. Oncogene, 2004. **23**(14): p. 2540-7.
1206. Naumann, M., et al., *NF-kappa B precursor p100 inhibits nuclear translocation and DNA binding of NF-kappa B/rel-factors*. Oncogene, 1993. **8**(8): p. 2275-81.
1207. Basak, S., V.F. Shih, and A. Hoffmann, *Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF-kappaB signaling system*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(10): p. 3139-50.
1208. Heissmeyer, V., et al., *NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes*. EMBO J, 1999. **18**(17): p. 4766-78.
1209. Orian, A., et al., *SCF(beta)-TrCP ubiquitin ligase-mediated processing of NF-kappaB p105 requires phosphorylation of its C-terminus by IkappaB kinase*. EMBO J, 2000. **19**(11): p. 2580-91.
1210. Latimer, M., et al., *The N-terminal domain of IkappaB alpha masks the nuclear localization signal(s) of p50 and c-Rel homodimers*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2640-9.



1211. Ishikawa, H., R.P. Ryseck, and R. Bravo, *Characterization of ES cells deficient for the p105 precursor (NF-kappa B1): role of p50 NLS*. *Oncogene*, 1996. **13**(2): p. 255-63.
1212. Fagerlund, R., et al., *NF-kappaB p52, RelB and c-Rel are transported into the nucleus via a subset of importin alpha molecules*. *Cell Signal*, 2008. **20**(8): p. 1442-51.
1213. Harhaj, E.W. and S.C. Sun, *Regulation of RelA subcellular localization by a putative nuclear export signal and p50*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(10): p. 7088-95.
1214. Stark, L.A. and M.G. Dunlop, *Nucleolar sequestration of RelA (p65) regulates NF-kappaB-driven transcription and apoptosis*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(14): p. 5985-6004.
1215. Shishodia, S. and B.B. Aggarwal, *Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death*. *J Biochem Mol Biol*, 2002. **35**(1): p. 28-40.
1216. Bennett, V. and S. Lambert, *The spectrin skeleton: from red cells to brain*. *J Clin Invest*, 1991. **87**(5): p. 1483-9.
1217. Lambert, S., et al., *cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(5): p. 1730-4.
1218. Hoffmann, A., et al., *The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation*. *Science*, 2002. **298**(5596): p. 1241-5.
1219. Brasier, A.R., *The NF-kappaB regulatory network*. *Cardiovasc Toxicol*, 2006. **6**(2): p. 111-30.
1220. Yamamoto, M., et al., *Regulation of Toll/IL-1-receptor-mediated gene expression by the inducible nuclear protein IkappaBzeta*. *Nature*, 2004. **430**(6996): p. 218-22.
1221. Motoyama, M., et al., *Positive and negative regulation of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by IkappaB-zeta, an inducible nuclear protein*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(9): p. 7444-51.
1222. Okamoto, K., et al., *IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors*. *Nature*, 2010. **464**(7293): p. 1381-5.
1223. Matsuo, S., et al., *Crucial roles of binding sites for NF-kappaB and C/EBPs in IkappaB-zeta-mediated transcriptional activation*. *Biochem J*, 2007. **405**(3): p. 605-15.

1224. Palmer, S. and Y.H. Chen, *Bcl-3, a multifaceted modulator of NF-kappaB-mediated gene transcription*. Immunol Res, 2008. **42**(1-3): p. 210-8.
1225. Ducut Sigala, J.L., et al., *Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit*. Science, 2004. **304**(5679): p. 1963-7.
1226. Chen, G., P. Cao, and D.V. Goeddel, *TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 401-10.
1227. Bren, G.D., et al., *Transcription of the RelB gene is regulated by NF-kappaB*. Oncogene, 2001. **20**(53): p. 7722-33.
1228. Chang, C.C., et al., *Mechanism of expression and role in transcriptional control of the proto-oncogene NFKB-2/LYT-10*. Oncogene, 1994. **9**(3): p. 923-33.
1229. Cogswell, P.C., R.I. Scheinman, and A.S. Baldwin, Jr., *Promoter of the human NF-kappa B p50/p105 gene. Regulation by NF-kappa B subunits and by c-REL*. J Immunol, 1993. **150**(7): p. 2794-804.
1230. Ito, C.Y., A.G. Kazantsev, and A.S. Baldwin, Jr., *Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(18): p. 3787-92.
1231. Yamazaki, S., et al., *Stimulus-specific induction of a novel nuclear factor-kappaB regulator, IkappaB-zeta, via Toll/Interleukin-1 receptor is mediated by mRNA stabilization*. J Biol Chem, 2005. **280**(2): p. 1678-87.
1232. Arenzana-Seisdedos, F., et al., *Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2689-96.
1233. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. Cell, 1995. **81**(4): p. 495-504.
1234. Rothe, M., et al., *A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1994. **78**(4): p. 681-92.
1235. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor 1-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181-90.
1236. Wang, C.Y., et al., *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1680-3.

1237. Li, S., L. Wang, and M.E. Dorf, *PKC phosphorylation of TRAF2 mediates IKKalpha/beta recruitment and K63-linked polyubiquitination*. Mol Cell, 2009. **33**(1): p. 30-42.
1238. Alvarez, S.E., et al., *Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2*. Nature, 2010. **465**(7301): p. 1084-8.
1239. Komander, D., *The emerging complexity of protein ubiquitination*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 5): p. 937-53.
1240. Fukushima, T., et al., *Ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 is a critical component of TNF receptor-associated factor (TRAF)-mediated inflammatory responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(15): p. 6371-6.
1241. Varfolomeev, E., et al., *c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2008. **283**(36): p. 24295-9.
1242. Bertrand, M.J., et al., *cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination*. Mol Cell, 2008. **30**(6): p. 689-700.
1243. Sakurai, H., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36916-23.
1244. Kanayama, A., et al., *TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 535-48.
1245. Gautheron, J. and G. Courtois, *"Without Ub I am nothing": NEMO as a multifunctional player in ubiquitin-mediated control of NF-kappaB activation*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(18):3101-13
1246. Shifera, A.S., *Protein-protein interactions involving IKKgamm (NEMO) that promote the activation of NF-kappaB*. J Cell Physiol, 2010. **223**(3): p. 558-61.
1247. Tokunaga, F., et al., *Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 123-32.
1248. Shinohara, H., et al., *PKC beta regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1*. J Exp Med, 2005. **202**(10): p. 1423-31.
1249. Oeckinghaus, A., et al., *Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation*. EMBO J, 2007. **26**(22): p. 4634-45.

1250. Wu, C.J. and J.D. Ashwell, *NEMO recognition of ubiquitinated Bcl10 is required for T cell receptor-mediated NF-kappaB activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3023-8.
1251. Xia, Z.P., et al., *Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains*. Nature, 2009. **461**(7260): p. 114-9.
1252. Fan, Y., et al., *Lysine 63-linked polyubiquitination of TAK1 at lysine 158 is required for tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-induced IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation*. J Biol Chem, 2010. **285**(8): p. 5347-60.
1253. Gustin, J.A., et al., *The PTEN tumor suppressor protein inhibits tumor necrosis factor-induced nuclear factor kappa B activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27740-4.
1254. Duwel, M., et al., *A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF-kappaB by cleaving Malt1 ubiquitin chains*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7718-28.
1255. He, K.L. and A.T. Ting, *A20 inhibits tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor 1 complex in Jurkat T cells*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(17): p. 6034-45.
1256. Kovalenko, A., et al., *The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 801-5.
1257. Nowak, D.E., et al., *RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF-kappaB-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(11): p. 3623-38.
1258. Moreno, R., et al., *Specification of the NF- $\kappa$ B transcriptional response by p65 phosphorylation and TNF-induced nuclear translocation of IKK $\epsilon$* . Nucleic Acids Res, 2010. **38**(18):6029-44.
1259. Sasaki, C.Y., et al., *Phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 defines an I $\kappa$ B $\alpha$ -independent NF- $\kappa$ B pathway*. J Biol Chem, 2005. **280**(41): p. 34538-47.
1260. Adli, M. and A.S. Baldwin, *IKK-i/IKKepsilon controls constitutive, cancer cell-associated NF-kappaB activity via regulation of Ser-536 p65/RelA phosphorylation*. J Biol Chem, 2006. **281**(37): p. 26976-84.
1261. Chen, L.F., et al., *NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(18): p. 7966-75.

1262. Yang, F., et al., *IKK beta plays an essential role in the phosphorylation of RelA/p65 on serine 536 induced by lipopolysaccharide*. J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5630-5.
1263. Vermeulen, L., et al., *Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1)*. EMBO J, 2003. **22**(6): p. 1313-24.
1264. Buss, H., et al., *Phosphorylation of serine 468 by GSK-3beta negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 49571-4.
1265. Mattioli, I., et al., *Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6175-83.
1266. Yang, X.D., E. Tajkhorshid, and L.F. Chen, *Functional interplay between acetylation and methylation of the RelA subunit of NF-kappaB*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(9): p. 2170-80.
1267. Yang, X.D., et al., *Negative regulation of NF-kappaB action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit*. EMBO J, 2009. **28**(8): p. 1055-66.
1268. Henle, W., *Interference phenomena between animal viruses; a review*. J Immunol, 1950. **64**(3): p. 203-36.
1269. Jungeblut, C.W., *Studies in Rodent Poliomyelitis : Vi. Further Observations on Interference between Murine and Simian Strains of Poliomyelitis Virus*. J Exp Med, 1945. **81**(3): p. 275-94.
1270. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
1271. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957*. J Interferon Res, 1987. **7**(5): p. 429-38.
1272. *Virus interference: I. The interferon. By Alick Isaacs and Jean Lindenmann, 1957*. CA Cancer J Clin, 1988. **38**(5): p. 280-90.
1273. Lockart, R.Z., Jr., T. Sreevalsan, and B. Horn, *Inhibition of viral RNA synthesis by interferon*. Virology, 1962. **18**: p. 493-4.
1274. Cocito, C., E. De Maeyer, and P. De Sonet, *Synthesis of messenger RNA in neoplastic cells treated in vitro with interferon*. Life Sci, 1962. **1**: p. 759-64.
1275. Chirigos, M.A., *In vivo therapy of oncogenic viruses*. Annu Rev Pharmacol, 1969. **9**: p. 431-56.

1276. Field, A.K., et al., *Inducers of interferon and host resistance, IV. Double-stranded replicative form RNA (MS2-Ff-RNA) from E. coli infected with MS2 coliphage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **58**(5): p. 2102-8.
1277. Smith, T.J. and R.R. Wagner, *Rabbit macrophage interferons. I. Conditions for biosynthesis by virus-infected and uninfected cells*. J Exp Med, 1967. **125**(4): p. 559-77.
1278. Youngner, J.S., *Interferon production by nonviral stimuli of microbial origin*. J Gen Physiol, 1970. **56**(1): p. 25-40.
1279. Wagner, R.R., *Inhibition of Interferon Biosynthesis by Actinomycin D*. Nature, 1964. **204**: p. 49-51.
1280. Ank, N., H. West, and S.R. Paludan, *IFN-lambda: novel antiviral cytokines*. J Interferon Cytokine Res, 2006. **26**(6): p. 373-9.
1281. Borden, E.C., et al., *Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(12): p. 975-90.
1282. Havell, E.A., et al., *Two antigenically distinct species of human interferon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(6): p. 2185-7.
1283. Wheelock, E.F. and W.A. Sibley, *Circulating Virus, Interferon and Antibody after Vaccination with the 17-D Strain of Yellow-Fever Virus*. N Engl J Med, 1965. **273**: p. 194-8.
1284. Weidle, U. and C. Weissmann, *The 5'-flanking region of a human IFN-alpha gene mediates viral induction of transcription*. Nature, 1983. **303**(5916): p. 442-6.
1285. Goodbourn, S., H. Burstein, and T. Maniatis, *The human beta-interferon gene enhancer is under negative control*. Cell, 1986. **45**(4): p. 601-10.
1286. Fujita, T., et al., *Interferon-beta gene regulation: tandemly repeated sequences of a synthetic 6 bp oligomer function as a virus-inducible enhancer*. Cell, 1987. **49**(3): p. 357-67.
1287. Goodbourn, S., K. Zinn, and T. Maniatis, *Human beta-interferon gene expression is regulated by an inducible enhancer element*. Cell, 1985. **41**(2): p. 509-20.
1288. Panne, D., T. Maniatis, and S.C. Harrison, *Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon-beta enhancer*. EMBO J, 2004. **23**(22): p. 4384-93.

1289. Keller, A.D. and T. Maniatis, *Identification of an inducible factor that binds to a positive regulatory element of the human beta-interferon gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(10): p. 3309-13.
1290. Miyamoto, M., et al., *Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements*. Cell, 1988. **54**(6): p. 903-13.
1291. Fujita, T., et al., *Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements*. EMBO J, 1988. **7**(11): p. 3397-405.
1292. Reis, L.F., et al., *Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN-beta and IFN-inducible genes*. EMBO J, 1992. **11**(1): p. 185-93.
1293. Matsuyama, T., et al., *Targeted disruption of IRF-1 or IRF-2 results in abnormal type I IFN gene induction and aberrant lymphocyte development*. Cell, 1993. **75**(1): p. 83-97.
1294. Au, W.C., et al., *Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(25): p. 11657-61.
1295. Thomason, H.A., et al., *Cooperation between the transcription factors p63 and IRF6 is essential to prevent cleft palate in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(5): p. 1561-9.
1296. Bailey, C.M. and M.J. Hendrix, *IRF6 in development and disease: a mediator of quiescence and differentiation*. Cell Cycle, 2008. **7**(13): p. 1925-30.
1297. Lu, R. and P.M. Pitha, *Monocyte differentiation to macrophage requires interferon regulatory factor 7*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 45491-6.
1298. Marecki, S., et al., *PU.1 and multiple IFN regulatory factor proteins synergize to mediate transcriptional activation of the human IL-1 beta gene*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6829-38.
1299. Castrillo, A., et al., *Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism*. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 805-16.
1300. Lin, R., Y. Mamane, and J. Hiscott, *Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34320-7.

1301. Schaper, F., et al., *Functional domains of interferon regulatory factor 1 (IRF-1)*. Biochem J, 1998. **335** ( Pt 1): p. 147-57.
1302. Huang, W., E. Horvath, and E.A. Eklund, *PU.1, interferon regulatory factor (IRF) 2, and the interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP/IRF8) cooperate to activate NF1 transcription in differentiating myeloid cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6629-43.
1303. Barnes, B.J., A.E. Field, and P.M. Pitha-Rowe, *Virus-induced heterodimer formation between IRF-5 and IRF-7 modulates assembly of the IFNA enhanceosome in vivo and transcriptional activity of IFNA genes*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 16630-41.
1304. Pandey, A.K., et al., *NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog, 2009. **5**(7): p. e1000500.
1305. Schoenemeyer, A., et al., *The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17005-12.
1306. Yarilina, A., et al., *TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 378-87.
1307. Negishi, H., et al., *Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(41): p. 15136-41.
1308. Tailor, P., et al., *The feedback phase of type I interferon induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8*. Immunity, 2007. **27**(2): p. 228-39.
1309. Honda, K. and T. Taniguchi, *IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(9): p. 644-58.
1310. Nguyen, H., J. Hiscott, and P.M. Pitha, *The growing family of interferon regulatory factors*. Cytokine Growth Factor Rev, 1997. **8**(4): p. 293-312.
1311. Schafer, S.L., et al., *Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3*. J Biol Chem, 1998. **273**(5): p. 2714-20.
1312. Weaver, B.K., K.P. Kumar, and N.C. Reich, *Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAFI*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(3): p. 1359-68.



1313. Yoneyama, M., et al., *Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300*. EMBO J, 1998. **17**(4): p. 1087-95.
1314. Lin, R., et al., *Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2986-96.
1315. Lin, R., Y. Mamane, and J. Hiscott, *Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2465-74.
1316. Sato, M., et al., *Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction*. Immunity, 2000. **13**(4): p. 539-48.
1317. Marie, I., J.E. Durbin, and D.E. Levy, *Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7*. EMBO J, 1998. **17**(22): p. 6660-9.
1318. Servant, M.J., N. Grandvaux, and J. Hiscott, *Multiple signaling pathways leading to the activation of interferon regulatory factor 3*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 985-92.
1319. Servant, M.J., et al., *Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9441-7.
1320. Servant, M.J., et al., *Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3*. J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 355-63.
1321. Lin, R., et al., *Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(17): p. 6342-53.
1322. Genin, P., A. Vaccaro, and A. Civas, *The role of differential expression of human interferon--a genes in antiviral immunity*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(4): p. 283-95.
1323. Kumar, K.P., et al., *Regulated nuclear-cytoplasmic localization of interferon regulatory factor 3, a subunit of double-stranded RNA-activated factor 1*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(11): p. 4159-68.

1324. Chen, W., et al., *Contribution of Ser386 and Ser396 to activation of interferon regulatory factor 3*. J Mol Biol, 2008. **379**(2): p. 251-60.
1325. Saitoh, T., et al., *Negative regulation of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1*. Nat Immunol, 2006. **7**(6): p. 598-605.
1326. Clement, J.F., et al., *Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association*. J Virol, 2008. **82**(8): p. 3984-96.
1327. Zhang, B., et al., *The TAK1-JNK cascade is required for IRF3 function in the innate immune response*. Cell Res, 2009. **19**(4): p. 412-28.
1328. Suhara, W., et al., *Direct involvement of CREB-binding protein/p300 in sequence-specific DNA binding of virus-activated interferon regulatory factor-3 holocomplex*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22304-13.
1329. Kubota, T., et al., *Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I interferon gene expression*. J Biol Chem, 2008. **283**(37): p. 25660-70.
1330. Fujita, F., et al., *Identification of NAPI1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7780-93.
1331. Kim, H.R., S.H. Lee, and G. Jung, *The hepatitis B viral X protein activates NF-kappaB signaling pathway through the up-regulation of TBK1*. FEBS Lett, 2010. **584**(3): p. 525-30.
1332. Wietek, C., et al., *IkappaB kinase epsilon interacts with p52 and promotes transactivation via p65*. J Biol Chem, 2006. **281**(46): p. 34973-81.
1333. Moreno, R., et al., *Specification of the NF-kappaB transcriptional response by p65 phosphorylation and TNF-induced nuclear translocation of IKK epsilon*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(18): p. 6029-44.
1334. Fitzgerald, K.A., et al., *IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 491-6.
1335. de Veer, M.J., et al., *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 912-20.

1336. Decker, T., et al., *Interactions of alpha- and gamma-interferon in the transcriptional regulation of the gene encoding a guanylate-binding protein*. EMBO J, 1989. **8**(7): p. 2009-14.
1337. Bhattacharya, S., et al., *Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha*. Nature, 1996. **383**(6598): p. 344-7.
1338. Schroder, M. and A.G. Bowie, *An arms race: innate antiviral responses and counteracting viral strategies*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 6): p. 1512-4.
1339. Prins, K.C., W.B. Cardenas, and C.F. Basler, *Ebola virus protein VP35 impairs the function of interferon regulatory factor-activating kinases IKKepsilon and TBK-1*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 3069-77.
1340. Ricour, C., et al., *Inhibition of mRNA export and dimerization of interferon regulatory factor 3 by Theiler's virus leader protein*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 1): p. 177-86.
1341. Okumura, A., et al., *HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation*. Virology, 2008. **373**(1): p. 85-97.
1342. Chen, Z., et al., *Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhea virus*. Virology, 2007. **366**(2): p. 277-92.
1343. Wang, D., et al., *Foot-and-mouth disease virus leader proteinase inhibits dsRNA-induced type I interferon transcription by decreasing interferon regulatory factor 3/7 in protein levels*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **399**(1): p. 72-8.
1344. Zhu, J., et al., *High-throughput screening for TLR3-IFN regulatory factor 3 signaling pathway modulators identifies several antipsychotic drugs as TLR inhibitors*. J Immunol, 2010. **184**(10): p. 5768-76.
1345. Elco, C.P., et al., *Analysis of genes induced by Sendai virus infection of mutant cell lines reveals essential roles of interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and interferon but not toll-like receptor 3*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 3920-9.
1346. Andersen, J., et al., *IRF-3-dependent and augmented target genes during viral infection*. Genes Immun, 2008. **9**(2): p. 168-75.
1347. Rani, M.R., et al., *Requirement of phosphoinositide 3-kinase and Akt for interferon-beta-mediated induction of the beta-R1 (SCYB11) gene*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38456-61.

1348. Rani, M.R. and R.M. Ransohoff, *Alternative and accessory pathways in the regulation of IFN-beta-mediated gene expression*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(12): p. 788-98.
1349. Bibeau-Poirier, A., et al., *Involvement of the IkappaB kinase (IKK)-related kinases tank-binding kinase 1/IKKi and cullin-based ubiquitin ligases in IFN regulatory factor-3 degradation*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5059-67.
1350. Panne, D., T. Maniatis, and S.C. Harrison, *An atomic model of the interferon-beta enhanceosome*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1111-23.
1351. Chattopadhyay, S., et al., *Viral apoptosis is induced by IRF-3-mediated activation of Bax*. EMBO J, 2010. **29**(10): p. 1762-73.
1352. Sweeney, S.E., L. Mo, and G.S. Firestein, *Antiviral gene expression in rheumatoid arthritis: role of IKKepsilon and interferon regulatory factor 3*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(3): p. 743-52.
1353. Sweeney, S.E., T.B. Kimbler, and G.S. Firestein, *Synoviocyte innate immune responses: II. Pivotal role of IFN regulatory factor 3*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 7162-8.
1354. Tang, E.D. and C.Y. Wang, *TRAF5 is a downstream target of MAVS in antiviral innate immune signaling*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9172.
1355. Chien, Y., et al., *RalB GTPase-mediated activation of the IkappaB family kinase TBK1 couples innate immune signaling to tumor cell survival*. Cell, 2006. **127**(1): p. 157-70.
1356. Adjei, A.A., *Ras signaling pathway proteins as therapeutic targets*. Curr Pharm Des, 2001. **7**(16): p. 1581-94.
1357. Unterholzner, L., et al., *IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA*. Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 997-1004.
1358. Yamaguchi, T., et al., *Induction of type I interferon by adenovirus-encoded small RNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(40): p. 17286-91.
1359. Yang, P., et al., *The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway*. Nat Immunol, 2010. **11**(6): p. 487-94.
1360. Rodel, J., et al., *Interferon-beta induction by Chlamydia pneumoniae in human smooth muscle cells*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2001. **32**(1): p. 9-15.

1361. Boehm, J.S., et al., *Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene*. Cell, 2007. **129**(6): p. 1065-79.
1362. Shen, R.R. and W.C. Hahn, *Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer*. Oncogene, 2011. **30**(6):631-41.
1363. Basseres, D.S. and A.S. Baldwin, *Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6817-30.
1364. Greten, F.R., et al., *IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer*. Cell, 2004. **118**(3): p. 285-96.
1365. Mayo, M.W., et al., *Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras*. Science, 1997. **278**(5344): p. 1812-5.
1366. Meylan, E., et al., *Requirement for NF-kappaB signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma*. Nature, 2009. **462**(7269): p. 104-7.
1367. Barbie, D.A., et al., *Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1*. Nature, 2009. **462**(7269): p. 108-12.
1368. Wu, H., G. Rossi, and P. Brennwald, *The ghost in the machine: small GTPases as spatial regulators of exocytosis*. Trends Cell Biol, 2008. **18**(9): p. 397-404.
1369. Camonis, J.H. and M.A. White, *Ral GTPases: corrupting the exocyst in cancer cells*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(6): p. 327-32.
1370. Eddy, S.F., et al., *Inducible IkappaB kinase/IkappaB kinase epsilon expression is induced by CK2 and promotes aberrant nuclear factor-kappaB activation in breast cancer cells*. Cancer Res, 2005. **65**(24): p. 11375-83.
1371. Guan, H., et al., *IKBKE is over-expressed in glioma and contributes to resistance of glioma cells to apoptosis via activating NF-kappaB*. J Pathol, 2011. **223**(3):436-45.
1372. Guo, J.P., et al., *Deregulation of IKBKE is associated with tumor progression, poor prognosis, and cisplatin resistance in ovarian cancer*. Am J Pathol, 2009. **175**(1): p. 324-33.
1373. Korherr, C., et al., *Identification of proangiogenic genes and pathways by high-throughput functional genomics: TBK1 and the IRF3 pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(11): p. 4240-5.

1374. Godl, K., et al., *Proteomic characterization of the angiogenesis inhibitor SU6668 reveals multiple impacts on cellular kinase signaling*. Cancer Res, 2005. **65**(15): p. 6919-26.
1375. Richards, S.A., et al., *Ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) activation requires signals dependent on and independent of the MAP kinase ERK*. Curr Biol, 1999. **9**(15): p. 810-20.
1376. Eguchi, S. and T. Inagami, *Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase*. Regul Pept, 2000. **91**(1-3): p. 13-20.
1377. Lee, D.F., et al., *IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway*. Cell, 2007. **130**(3): p. 440-55.
1378. Ellisen, L.W., *Growth control under stress: mTOR regulation through the REDD1-TSC pathway*. Cell Cycle, 2005. **4**(11): p. 1500-02.
1379. Rodems, S.M. and D.H. Spector, *Extracellular signal-regulated kinase activity is sustained early during human cytomegalovirus infection*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 9173-80.
1380. Voisin, L., et al., *EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(2): p. C446-55.
1381. Shah, B.H., et al., *Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs*. J Cell Physiol, 2006. **206**(1): p. 47-57.
1382. Witherow, D.S., et al., *beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8603-7.
1383. Mattioli, I., et al., *Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6336-44.
1384. Bohuslav, J., et al., *p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26115-25.
1385. Chen, L.F., et al., *NF-{kappa}B RelA phosphorylation regulates RelA acetylation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(18): p. 7966-75.

1386. Doyon, P. and M.J. Servant, *Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 and ribosomal S6 kinase intracellular pathways link the angiotensin II AT1 receptor to the phosphorylation and activation of the IkappaB kinase complex in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(40): p. 30708-18.
1387. Cyranoski, D., *Profile: Innate ability*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 475-7.
1388. Rafailidis, P.I., et al., *Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review*. Virol J, 2008. **5**: p. 47.
1389. Georges, J.L., et al., *Impact of pathogen burden in patients with coronary artery disease in relation to systemic inflammation and variation in genes encoding cytokines*. Am J Cardiol, 2003. **92**(5): p. 515-21.
1390. Nazmi, A., et al., *The influence of persistent pathogens on circulating levels of inflammatory markers: a cross-sectional analysis from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*. BMC Public Health, 2010. **10**: p. 706.
1391. Strandberg, T.E., K.H. Pitkala, and R.S. Tilvis, *Cytomegalovirus antibody level and mortality among community-dwelling older adults with stable cardiovascular disease*. JAMA, 2009. **301**(4): p. 380-2.
1392. Ohmori, Y. and T.A. Hamilton, *The interferon-stimulated response element and a kappa B site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN-gamma and TNF-alpha*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5235-44.
1393. Michelson, S., et al., *Modulation of RANTES production by human cytomegalovirus infection of fibroblasts*. J Virol, 1997. **71**(9): p. 6495-500.
1394. Daffis, S., et al., *Induction of IFN-beta and the innate antiviral response in myeloid cells occurs through an IPS-1-dependent signal that does not require IRF-3 and IRF-7*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000607.
1395. Marshall, E.E. and A.P. Geballe, *Multifaceted evasion of the interferon response by cytomegalovirus*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(9): p. 609-19.
1396. Browne, E.P. and T. Shenk, *Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11439-44.
1397. Abate, D.A., S. Watanabe, and E.S. Mocarski, *Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response*. J Virol, 2004. **78**(20): p. 10995-1006.

1398. Noyce, R.S., S.E. Collins, and K.L. Mossman, *Identification of a novel pathway essential for the immediate-early, interferon-independent antiviral response to enveloped virions*. J Virol, 2006. **80**(1): p. 226-35.
1399. Nociari, M., et al., *Adenovirus induction of IRF3 occurs through a binary trigger targeting Jun N-terminal kinase and TBK1 kinase cascades and type I interferon autocrine signaling*. J Virol, 2009. **83**(9): p. 4081-91.
1400. Lusso, P., *HIV and the chemokine system: 10 years later*. EMBO J, 2006. **25**(3): p. 447-56.
1401. Soroceanu, L., A. Akhavan, and C.S. Cobbs, *Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection*. Nature, 2008. **455**(7211): p. 391-5.
1402. Feire, A.L., et al., *The glycoprotein B disintegrin-like domain binds beta 1 integrin to mediate cytomegalovirus entry*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 10026-37.
1403. Dixit, E., et al., *Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity*. Cell, 2010. **141**(4): p. 668-81.
1404. Lin, R., S. Paz, and J. Hiscott, *Tom70 imports antiviral immunity to the mitochondria*. Cell Res, 2010. **20**(9): p. 971-3.
1405. Ishii, K.J., et al., *A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA*. Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 40-8.
1406. Sun, Q., et al., *The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses*. Immunity, 2006. **24**(5): p. 633-42.
1407. Cheng, G., et al., *Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 9035-40.
1408. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 93-103.
1409. Takaoka, A., et al., *DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 501-5.
1410. Wang, Z., et al., *Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5477-82.



1411. Lippmann, J., et al., *IFN $\beta$  responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI)*. Cell Microbiol, 2008. **10**(12): p. 2579-88.
1412. Muruve, D.A., et al., *The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response*. Nature, 2008. **452**(7183): p. 103-7.
1413. Hornung, V., et al., *AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 514-8.
1414. Fernandes-Alnemri, T., et al., *AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 509-13.
1415. Burckstummer, T., et al., *An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome*. Nat Immunol, 2009. **10**(3): p. 266-72.
1416. Ablasser, A., et al., *RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate*. Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1065-72.
1417. Chiu, Y.H., J.B. Macmillan, and Z.J. Chen, *RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway*. Cell, 2009. **138**(3): p. 576-91.
1418. Hornung, V., et al., *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. Science, 2006. **314**(5801): p. 994-7.
1419. Choi, M.K., et al., *A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17870-5.
1420. DeFilippis, V.R., et al., *Human cytomegalovirus induces the interferon response via the DNA sensor ZBP1*. J Virol, 2010. **84**(1): p. 585-98.
1421. Nakhaei, P., J. Hiscott, and R. Lin, *STING-ing the antiviral pathway*. J Mol Cell Biol, 2010. **2**(3): p. 110-2.
1422. Guo, W. and P. Novick, *The exocyst meets the translocon: a regulatory circuit for secretion and protein synthesis?* Trends Cell Biol, 2004. **14**(2): p. 61-3.
1423. Ishikawa, H. and G.N. Barber, *STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling*. Nature, 2008. **455**(7213): p. 674-8.

1424. Liu, X.Y., et al., *Tom70 mediates activation of interferon regulatory factor 3 on mitochondria*. Cell Res, 2010. **20**(9): p. 994-1011.
1425. Hayakawa, S., et al., *ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(1): p. 37-44.
1426. Sun, W., et al., *ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(21): p. 8653-8.
1427. Sauer, J.D., et al., *The ENU-induced Goldenticket (Gt) mouse mutant reveals an essential function of Sting (Tmem173, Mita, Mpys, Eris) in the in vivo interferon response to Listeria monocytogenes and cyclic-di-nucleotides*. Infect Immun, 2011. **79**(2):688-94.
1428. Bresnahan, W.A., G.E. Hultman, and T. Shenk, *Replication of wild-type and mutant human cytomegalovirus in life-extended human diploid fibroblasts*. J Virol, 2000. **74**(22): p. 10816-8.
1429. Schroder, M., *Human DEAD-box protein 3 has multiple functions in gene regulation and cell cycle control and is a prime target for viral manipulation*. Biochem Pharmacol, 2010. **79**(3): p. 297-306.
1430. Imaizumi, T., et al., *Retinoic acid-inducible gene-I is induced in endothelial cells by LPS and regulates expression of COX-2*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(1): p. 274-9.
1431. Cui, X.F., et al., *Retinoic acid-inducible gene-I is induced by interferon-gamma and regulates the expression of interferon-gamma stimulated gene 15 in MCF-7 cells*. Biochem Cell Biol, 2004. **82**(3): p. 401-5.
1432. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
1433. Kang, D.C., et al., *mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 637-42.
1434. Trapani, J.A., et al., *A novel gene constitutively expressed in human lymphoid cells is inducible with interferon-gamma in myeloid cells*. Immunogenetics, 1992. **36**(6): p. 369-76.

1435. Dawson, M.J. and J.A. Trapani, *IFI 16 gene encodes a nuclear protein whose expression is induced by interferons in human myeloid leukaemia cell lines*. J Cell Biochem, 1995. **57**(1): p. 39-51.
1436. Imaizumi, T., et al., *Expression of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) in macrophages: possible involvement of RIG-I in atherosclerosis*. J Atheroscler Thromb, 2007. **14**(2): p. 51-5.
1437. Imaizumi, T., et al., *Expression of retinoic acid-inducible gene-I in vascular smooth muscle cells stimulated with interferon-gamma*. Life Sci, 2004. **75**(10): p. 1171-80.
1438. Imaizumi, T., et al., *Interferon-gamma induces retinoic acid-inducible gene-I in endothelial cells*. Endothelium, 2004. **11**(3-4): p. 169-73.
1439. Imaizumi, T., et al., *Double-stranded RNA induces the synthesis of retinoic acid-inducible gene-I in vascular endothelial cells*. Endothelium, 2005. **12**(3): p. 133-7.
1440. Liu, N., et al., *C-reactive protein triggers inflammatory responses partly via TLR4/IRF3/NF-kappaB signaling pathway in rat vascular smooth muscle cells*. Life Sci, 2010. **87**(11-12): p. 367-74.
1441. Zhang, L., et al., *Dual pathways for nuclear factor kappaB activation by angiotensin II in vascular smooth muscle: phosphorylation of p65 by IkappaB kinase and ribosomal kinase*. Circ Res, 2005. **97**(10): p. 975-82.
1442. Clark, K., et al., *Novel cross-talk within the IKK family controls innate immunity*. Biochem J, 2011. **434**(1):93-104.
1443. Grabiner, B.C., et al., *CARMA3 deficiency abrogates G protein-coupled receptor-induced NF- $\kappa$ B activation*. Genes Dev, 2007. **21**(8): p. 984-96.
1444. McAllister-Lucas, L.M., et al., *CARMA3/Bcl10/MALT1-dependent NF-kappaB activation mediates angiotensin II-responsive inflammatory signaling in nonimmune cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(1): p. 139-44.
1445. Iwai, K. and F. Tokunaga, *Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation*. EMBO Rep, 2009. **10**(7): p. 706-13.
1446. Wang, Y., et al., *Association of beta-arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling*. Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 139-47.
1447. Cao, W., et al., *Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway*. Nat Immunol, 2008. **9**(10): p. 1157-64.

1448. Weichhart, T., et al., *The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response*. Immunity, 2008. **29**(4): p. 565-77.
1449. Kaur, S., et al., *Role of the Akt pathway in mRNA translation of interferon-stimulated genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(12): p. 4808-13.
1450. Alain, T., et al., *Vesicular stomatitis virus oncolysis is potentiated by impairing mTORC1-dependent type I IFN production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1576-81.
1451. Ma, L., et al., *Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis*. Cell, 2005. **121**(2): p. 179-93.
1452. Roux, P.P., et al., *Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13489-94.
1453. Nave, B.T., et al., *Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation*. Biochem J, 1999. **344 Pt 2**: p. 427-31.
1454. Ueda, T., et al., *Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(15): p. 6539-49.
1455. Atkins, C.M., et al., *Cytoplasmic polyadenylation element binding protein-dependent protein synthesis is regulated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. J Neurosci, 2004. **24**(22): p. 5193-201.
1456. Sarkissian, M., R. Mendez, and J.D. Richter, *Progesterone and insulin stimulation of CPEB-dependent polyadenylation is regulated by Aurora A and glycogen synthase kinase-3*. Genes Dev, 2004. **18**(1): p. 48-61.
1457. Keady, B.T., et al., *MAPK interacts with XGef and is required for CPEB activation during meiosis in Xenopus oocytes*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 6): p. 1093-103.
1458. Greten, F.R., et al., *NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta*. Cell, 2007. **130**(5): p. 918-31.
1459. Nagashima, K., et al., *Rapid TNFR1-dependent lymphocyte depletion in vivo with a selective chemical inhibitor of IKKbeta*. Blood, 2006. **107**(11): p. 4266-73.

1460. Vereecke, L., R. Beyaert, and G. van Loo, *The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology*. Trends Immunol, 2009. **30**(8): p. 383-91.
1461. Chen, L.W., et al., *The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 575-81.
1462. Ogawa, H., et al., *IkappaB kinase beta inhibitor IMD-0354 suppresses airway remodelling in a Dermatophagoides pteronyssinus-sensitized mouse model of chronic asthma*. Clin Exp Allergy, 2011. **41**(1): p. 104-15.
1463. Gillooly, K.M., et al., *Periodic, partial inhibition of IkappaB Kinase beta-mediated signaling yields therapeutic benefit in preclinical models of rheumatoid arthritis*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **331**(2): p. 349-60.
1464. Yin, M.J., Y. Yamamoto, and R.B. Gaynor, *The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta*. Nature, 1998. **396**(6706): p. 77-80.
1465. Jung, K.J., et al., *Effect of short-term, low dose aspirin supplementation on the activation of pro-inflammatory NF-kappaB in aged rats*. Mech Ageing Dev, 2006. **127**(3): p. 223-30.
1466. Rothwell, P.M., et al., *Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials*. Lancet, 2011. **377**(9759):31-41.
1467. Xia, X., et al., *Reduction of IKKalpha expression promotes chronic ultraviolet B exposure-induced skin inflammation and carcinogenesis*. Am J Pathol, 2010. **176**(5): p. 2500-8.
1468. Liu, B., et al., *Proinflammatory stimuli induce IKKalpha-mediated phosphorylation of PLAS1 to restrict inflammation and immunity*. Cell, 2007. **129**(5): p. 903-14.
1469. Feldman, R.I., et al., *Novel small molecule inhibitors of 3-phosphoinositide-dependent kinase-I*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19867-74.
1470. Bain, J., et al., *The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update*. Biochem J, 2007. **408**(3): p. 297-315.
1471. Roberts, Z.J., et al., *The chemotherapeutic agent DMXAA potently and specifically activates the TBK1-IRF-3 signaling axis*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1559-69.

1472. McWhirter, S.M., et al., *IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(1): p. 233-8.
1473. Lei, C.Q., et al., *Glycogen Synthase Kinase 3beta Regulates IRF3 Transcription Factor-Mediated Antiviral Response via Activation of the Kinase TBK1*. Immunity, 2010. **33**(6): p. 878-89.
1474. Marchlik, E., et al., *Mice lacking Tbk1 activity exhibit immune cell infiltrates in multiple tissues and increased susceptibility to LPS-induced lethality*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(6): p. 1171-80.
1475. Molto, A. and A. Olive, *Anti-IL-1 molecules: new comers and new indications*. Joint Bone Spine, 2010. **77**(2): p. 102-7.
1476. Taylor, P.C. and M. Feldmann, *Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2009. **5**(10): p. 578-82.

